



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



MARCO ANTONIO CARVALHO
Cirurgião-Dentista

**ESTUDO DAS CONSEQUÊNCIAS DO BLOQUEIO DA PRODUÇÃO
ENDÓGENA DE ÁCIDOS GRAXOS SOBRE A EXPRESSÃO DAS
INTEGRINAS E MMPs EM MODELO MURINO DE MELANOMA.**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do Título de Doutor em
Estomatopatologia na área de Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner

PIRACICABA

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª. / 8099

C253e	<p>Carvalho, Marco Antonio. Estudo das consequências do bloqueio da produção endógena de ácidos graxos sobre a expressão das integrinas e MMPs em modelo murino de melanoma / Marco Antonio Carvalho. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientador: Edgard Graner. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Metástase. 2. Camundongo. 3. Metaloproteases. 4. Ácidos graxos. I. Graner, Edgard. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(eras/fop)</p>
-------	--

Título em Inglês: Effects of the fatty synthesis blockage on the integrin and matrix metalloproteases expression in mouse melanoma

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Metastasis. 2. Mice. 3. Metalloproteases. 4. Fatty acids

Área de Concentração: Patologia

Titulação: Doutor em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Edgard Graner, Márcio Ajudarte Lopes, Jacks Jorge Júnior, Ademar Takahama Júnior, Cláudia Aparecida Rainho

Data da Defesa: 02-12-2010

Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 02 de Dezembro de 2010, considerou o candidato MARCO ANTONIO CARVALHO aprovado.

Prof. Dr. EDGARD GRANER

Prof. Dr. ADEMAR TAKAHAMA JUNIOR

Profa. Dra. CLÁUDIA APARECIDA RAINHO

Prof. Dr. JACKS JORGE JÚNIOR

Prof. Dr. MARCIO AJUDARTE LOPES

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Sérgio e Olga**, por todo apoio e dedicação ao longo de tantos anos e por sempre acreditarem que a maior herança deixada aos filhos é o amor a retidão e a humildade, o meu eterno muito obrigado.*

*Aos meus irmãos **Sérgio, Marco Aurélio e Rosângela**, por serem meus companheiros de todos os momentos, sempre me aconselhando e indicando os melhores caminhos a seguir.*

*A minha companheira, amiga, parceira e amor eterno **Ana Paula Correa** pelo carinho, amor, dedicação e imensa paciência durante este período tão importante em minha vida, minha eterna gratidão.*

Ao meu orientador **Professor Dr. Edgard Graner**, pelo comprometimento para com o meu aprendizado, conduzindo estes anos de forma serena e profissional. Pela sua dedicação, humildade e capacidade tornou-se um exemplo a ser seguido. Registro assim todo meu respeito, admiração e profundo agradecimento.

“A persistência é o caminho do êxito.”

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi construído e realizado com o apoio de muitas pessoas e instituições, dentre as quais gostaria de agradecer especialmente:

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**;

Ao **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP;

Aos Profs. **Drs. Oslei Paes de Almeida, Edgard Graner, Ricardo Della Coletta, Márcio Ajudarte Lopes, Pablo Agustin Vargas, Jacks Jorge Júnior**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, por todos os ensinamentos transmitidos;

Em especial aos Profs. Drs. **Jacks Jorge Júnior e Márcio Ajudarte Lopes** pela confiança, apoio e seriedade desde os tempos de estágio no Orocentro, os quais me fizeram despertar um imenso interesse pela ciência, meu profundo agradecimento e respeito;

Ao Prof. Dr. **Oslei Paes de Almeida** pelo apoio irrestrito ao uso das instalações e equipamentos do laboratório do departamento de Estomatopatologia sem o qual muito dos resultados obtidos neste trabalho não seriam possíveis;

Aos meus amigos do coração **Luis Fernando Oliveira, Lilian, Alexandre, Helena, Stanley, Flávia, Jorge, Érica, Luís Otávio, Rosiane, Luís Fernando Tabai e Vera** pela amizade verdadeira e momentos de descontração ao longo de tantos anos;

À colega de doutorado **Lays Martin Sobral**, pela amizade sincera construída;

Às colegas de bancada **Michelle Agostini, Manuela Carrera, Andréia Bufalino, Carolina Bitu, Rosemeire Ortega, Débora Bastos e Fabiana Seguin** pelos ensinamentos, parceria e momentos de descontração;

Aos demais amigos e colegas da pós-graduação **Ana Terezinha, Renato, Bruno, Patricia, Wilfredo, Jorge, Mario, Alan, Carol, Fernanda, Adriele, Daniel e Vitor** pelos momentos de estudo e diversão compartilhados;

À amiga Profa. Dra. **Karina Gottardelo Zecchin** do Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP pela valiosa contribuição durante os experimentos realizados.

Ao amigo **Sr. Adriano Luís Martins**, biólogo e funcionário da Faculdade de Odontologia de Piracicaba meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos sobre os equipamentos, soluções, treinamentos e pelo auxílio na obtenção das imagens com o microscópio confocal, processos indispensáveis na produção desta tese, sem esquecer a amizade construída ao longo destes anos;

Aos demais funcionários da Patologia e Estomatologia, **Joãozinho, Fabiana e Giovania** e aos funcionários e amigos do Orocentro onde comecei esta caminhada **Rogério, Lúcia, Débora** e a **Sra. Aparecida Conceição Campion**, pelo auxílio, colaboração e generosidade;

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão de bolsa durante o período deste doutorado n° 07/58158-8;

Por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram e incentivaram esta jornada, guardarei sempre lembranças maravilhosas destes momentos.

EPÍGRAFE

"A ciência é a tentativa de compreender a realidade. É uma atividade quase religiosa, na mais ampla acepção da palavra."

(George Wald)

RESUMO

O melanoma é, dentre as neoplasias malignas de pele, a de pior prognóstico devido ao seu alto potencial metastático e resistência aos agentes quimioterápicos existentes. A enzima metabólica ácido graxo sintase (FASN, EC2.3.1.85) é a responsável por catalisar a síntese de ácidos graxos saturados de cadeia longa. FASN é um homodímero com massa molecular de 250 kDa responsável pela produção do palmitato endógeno. Em tecidos normais, a atividade metabólica de FASN é mínima, uma vez que a maior parte dos ácidos graxos usados pelas células provém da dieta, com exceção dos tecidos lipogênicos. Por outro lado, tem sido demonstrado que nas células malignas a maior parte dos ácidos graxos provém da biossíntese endógena conseqüente ao aumento da atividade de FASN e que existe uma associação positiva entre a expressão desta enzima metabólica e o comportamento agressivo de tumores malignos, pois sua alta expressão ocorre principalmente em casos com prognóstico ruim. Inibidores específicos da atividade FASN bloqueiam a síntese de DNA e causam apoptose em linhagens celulares derivadas de neoplasias malignas de próstata, mama, cólon, estômago, intestino, endométrio, cavidade bucal, ovário e melanoma. A droga orlistat (Xenical®), aprovada pela FDA e utilizada para o tratamento de obesidade, foi descrita como tendo propriedades anti-neoplásicas em câncer de próstata, mama, cólon, estômago e melanoma, devido a sua capacidade de bloquear especificamente a atividade de FASN. Este trabalho teve como objetivo principal estudar o efeito do tratamento de camundongos C57BL6 com a droga orlistat sobre as atividades de MMPs, expressão de integrinas por células B16F10, adesão destas últimas à macromoléculas da MEC e formação de colônias pulmonares a partir da inoculação na veia caudal de camundongos C57BL6. Através de ensaios zimográficos, não observamos alterações das atividades de MMP-2 e -9 em células B16F10 tratadas com orlistat. No entanto, a inibição de FASN aumentou a

adesão das células B16F10 aos componentes de matrix extracelular laminina e fibronectina. Através de ensaios de imunofluorescência observamos uma redução das regiões de adesão focal das integrinas $\alpha\beta 3$ nas células B16F10 tratadas com orlistat. Finalmente, o tratamento com orlistat reduziu em 53,6% o número de colônias metastáticas pulmonares, em comparação aos grupos controle. Em conjunto, os resultados aqui descritos sugerem que esta FASN é um alvo terapêutico em potencial para estes tumores.

Palavras chave: melanoma / integrinas / Ácido graxo sintase / orlistat / metástase / metaloproteases de matriz/ células B16F10 / camundongo

ABSTRACT

Malignant melanoma has poor prognosis due to its high metastatic potential and resistance to the existing chemotherapeutic agents. Fatty acid synthase (FASN, EC2.3.1.58) is a metabolic enzyme with molecular mass of 250 kDa responsible for the endogenous biosynthesis of saturated long chain fatty acids. FASN activity is relatively low in most normal human tissues, since most of the fatty acids used by the cells come from the diet, except in liver, adipose tissue, fetal lung and lactating breast. On the other hand, it has been demonstrated that in several cultured malignant cells fatty acids are mostly produced by FASN. A similar phenomenon is also observed in melanoma cells and overexpression of FASN has been associated with a poor prognosis for patients with this malignancy. Specific inhibitors of FASN activity block DNA synthesis and cause apoptosis in prostate, breast, colon, stomach, endometrial, oral cavity, ovary and melanoma cancer cells lines. Orlistat (Xenical®), approved for FDA and used for the treatment of obesity, has antitumor properties in prostate, breast, colon, gastric cancers and melanoma, due to its capacity to block the FASN activity. This work had as main objectives to study the effect of orlistat on the expression and activity of MMPs and expression of integrins in B16F10 cells, as well as on the adhesion of these cells to ECM macromolecules fibronectin and laminin. Moreover, we sought to verify the effect of this drug on the lung colonization by B16F10 inoculated in the tail vein of C57BL6 mice. The treatment with orlistat did not change MMP-2 and -9 gelatinolytic activities in B16F10 cells and enhanced the adhesion of these cells on laminin or fibronectin. Interestingly, treatment of B16F10 cells with orlistat promoted a reduction on the number of integrin $\alpha\beta 3$ focal adhesion plates observed in the immunofluorescence assay. Finally, orlistat promoted an inhibition of 53,6% in the number of lung metastatic foci, in comparison with the control groups, further confirming the anticancer potential of FASN inhibitors. Finally, the results here described suggest that FASN is a therapeutical target in potential for these tumors.

Key words: melanoma / fatty acid synthase / integrins / metastasis / orlistat / metalloproteases / B16F10 cells / mice

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC – American type culture collection

DTT - Ditionitrito

DMSO - Di-metil sulfóxido

EDTA – Ácido etileno diamino tetracético

EGF – “Epidermal Growth Factor” – Fator de crescimento epidérmico

ErbB2 - "Human Epidermal Growth Factor Receptor 2" – Receptor de fator de crescimento epidérmico humano

FAK – Quinases de adesão focal

FASN - “Fatty acid synthase” – Ácido graxo sintase

FBS - “Fetal Bovine Serum” - Soro fetal bovino

HIF-1 α – Fator indutor de hipóxia - 1 α

IARC – Agência Internacional de Pesquisa do Câncer

IP - Intraperitoneal

IV - Intravenoso

kDa – Quilodaltons

MAPK – “Mitogen-activated protein kinase” – Proteína-quinase ativada por mitógeno

MMP – Metaloprotease de Matriz

PBS - “Phosphate Buffered Saline” - Solução salina tamponada com fosfato

PI-3K - “Phosphatidylinositol -3- kinase” - Fosfatidilinositol-3-quinase

PMSF - "Phenylmethylsulfonyl fluoride" - Fenilmetilsulfonil fluoreto

SDS - “Sodium Dodecyl Sulphate” – Dodecil Sulfato de Sódio

STI - “Soybean Trypsin Inhibitor” – Inibidor de tripsina derivado da soja

VEGF – “Vascular Epidermal Growth Factor” – Fator de Crescimento Epidérmico Vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Melanoma	4
2.2. Ácido graxo sintase (FASN)	7
2.3. Inibidores de FASN	11
2.3.1. Cerulenina	11
2.3.2. C75	11
2.3.3. Orlistat	12
2.3.4. Outros Inibidores	13
2.4. Metaloproteases de Matriz (MMPs) e Câncer	14
2.5. Integrinas e Câncer	16
3. OBJETIVOS	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. Cultura de células	20
4.2. Preparo das soluções de Orlistat	20
4.3. Ensaio zimográficos	20
4.4. Ensaio de Adesão	21
4.5. Modelo animal para o estudo de metástases de melanoma	21
4.6. Ensaio de imunofluorescência	22
4.7. Análise Estatística	23
5. RESULTADOS	24
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60
ANEXOS	78
ANEXO I Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal	79

1. INTRODUÇÃO

Tem sido claramente demonstrado na literatura científica da última década que em células malignas a maior parte dos ácidos graxos provém da biossíntese endógena conseqüente ao aumento da atividade de FASN (Baron *et al.* 2004) e que existe uma associação positiva entre a expressão desta enzima metabólica e o comportamento agressivo de tumores malignos (Epstein *et al.*, 1995; Alo *et al.*, 1996; Gansler *et al.*, 1997; Kuhajda, 2000b). Em virtude destes achados, FASN vem sendo apontada como um alvo para a quimioterapia e até quimioprevenção, desde que inibidores específicos da sua atividade são capazes de bloquear a progressão do ciclo celular, diminuindo a proliferação e aumentando as taxas de apoptose, o que já foi demonstrado em células de câncer de próstata, mama, estômago, endométrio, cavidade bucal e ovário (Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001; Agostini *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2005; Menendez *et al.*, 2006). Dentre as neoplasias de pele, o melanoma é a de pior prognóstico. Seu alto índice de mortalidade deve-se principalmente ao desenvolvimento de metástases para diversos órgãos como fígado, pulmões, cérebro, ossos, ovário, estômago, pâncreas e intestino delgado (Hawes *et al.*, 2001; Rodolfo *et al.*, 2004; Feldman *et al.*, 2004; Atallah & Flaherty, 2005; Katz *et al.*, 2005; McWilliams *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2006; Belagyi *et al.*, 2006). Existem, até o presente momento, quatro trabalhos descrevendo a expressão de FASN em melanomas. Destes destaca-se o de Innocenzi *et al.* (2003), que observaram uma correlação positiva entre a expressão de FASN e o índice de Breslow e uma correlação inversa entre FASN e a sobrevida dos pacientes. De maneira semelhante, Kapur *et al.* (2005) demonstraram uma correlação positiva entre os níveis de FASN e o grau de diferenciação histológica de melanomas. Nesta mesma neoplasia, o aumento da expressão de MMP-1, -2, -9 e -13 parece estar associado a metástases hematogênicas, com um pior prognóstico para os pacientes (Väisänen *et al.*, 1999; Nikkola *et al.*, 2005). As integrinas α IIb β 3, α 2 β 1, α 5 β 1, α 4 β 1, e α V β 3 apresentam níveis elevados em melanomas humanos (Kuphal *et al.*, 2005), sendo a expressão de β 1, α 6 β 1, β 3 e α V associada a um comportamento clínico mais agressivo

(Hirken *et al.*, 1999; Anastassiou *et al.*, 2000; Elshaw *et al.*, 2001; Nikkola *et al.*, 2004). Da mesma forma, as integrinas $\alpha 3 \beta 1$ e $\alpha V \beta 3$ estão correlacionadas com metástases linfáticas experimentais provocadas por linhagens derivadas de câncer de mama e de melanoma de camundongo (Nip *et al.*, 1992; Tawil *et al.*, 1996), sendo $\beta 1$ correlacionada à metástase linfática em melanoma humano (Hieken *et al.*, 1995). Em nossa dissertação de mestrado, observamos que camundongos C57BL6 tratados com o inibidor específico de FASN orlistat têm diminuição da síntese endógena de lipídios e, mais importante, apresentam redução de 50% no número de metástases experimentais para linfonodos mediastínicos (Carvalho *et al.* 2008). No presente trabalho, foi demonstrado um aumento da adesão das células B16F10 tratadas com orlistat ou cerulenina à proteína de membrana basal laminina, se comparadas aos seus respectivos controles ETOH ou DMSO. Em altas concentrações, orlistat produziu uma significativa inibição da adesão das células B16F10 tanto à laminina como à fibronectina, provavelmente resultado de um efeito citotóxico. Os ensaios zimográficos para MMP-2 e -9 demonstraram que a inibição da síntese de ácidos graxos parece não interferir na atividade destas metaloproteases na linhagem celular B16F10. Não houve diferenças estatisticamente significantes na atividade gelatinolítica destas enzimas na presença de orlistat ou do seu veículo ETOH, mesmo após a normalização dos resultados pelo número de células presentes nos frascos de cultura ou pela concentração do DNA total dos *pellets* celulares. Interessantemente, observamos que o tratamento de células B16F10 com orlistat apresentou uma redução do número de adesões focais das integrinas $\alpha V \beta 3$ frente ao grupo controle (ETOH) o que pode de algum modo estar relacionado com a redução do número de colônias pulmonares observadas no modelo animal de metástase experimental. Finalmente, ficou evidente em nossos experimentos em camundongos que a inibição farmacológica de FASN com orlistat contribui para uma redução significativa (53,6%) do número de colônias metastáticas pulmonares formadas após a inoculação das células B16F10 na veia caudal. Em conjunto, estes resultados mostram que a inibição de FASN interfere na adesão das células de melanoma a proteínas da matriz extracelular e que tratamento de animais inoculados com células B16F10 inibe a formação das metástases pulmonares

experimentais, o que aparentemente não foi modulado pela atividade de MMP-2 e -9.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Melanoma

Melanomas são neoplasias malignas que se originam a partir de lesões melanocíticas pré-existentes ou se desenvolvem em pele ou mucosa normais (*de novo*). Os melanoblastos (precursores dos melanócitos) são células provenientes da crista neural que migram para a pele, retina, meninges e mucosas oro nasal e respiratória entre a 12ª e 14ª semana de vida intra-uterina (Quevedo & Fleischmann, 1980; Nordlund, 1986; Erickson, 1993). Estas células encontram-se na camada de células basais e apresentam aspecto dendrítico, possuem núcleo irregular e central e citoplasma globoso, do qual partem prolongamentos, que funcionam como vias de transferência da melanina para os queratinócitos da própria camada basal. Os grânulos de melanina se dispõem ao redor do núcleo do queratinócito para impedir lesões no DNA pelos raios ultravioleta (Jimbow *et al.*, 1993). A melanina atua absorvendo a radiação UV e possui potentes propriedades antioxidantes que neutralizam a produção de radicais livres produzidos pela radiação UV (Rees *et al.* 2004)

Pelo fato desta neoplasia possuir a característica de emitir numerosas metástases, ela está entre os tumores com pior prognóstico e alto índice de mortalidade. Os portadores de melanoma podem desenvolver metástases em diversos órgãos, como fígado, pulmões, cérebro, ossos, ovário, estômago, pâncreas e intestino delgado (Hawes *et al.*, 2001; Rodolfo *et al.*, 2004; Feldman *et al.*, 2004; Atallah & Flaherty, 2005; Katz *et al.*, 2005; McWilliams *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2006; Belagyi *et al.*, 2006). Durante as últimas décadas, tem sido observado um grande aumento na incidência de melanomas cutâneos entre as populações caucasianas ao redor do mundo, que gira em torno de 3 a 7% ao ano, segundo um levantamento feito entre 23 países, incluindo o Brasil (dados em International Agency for Research Cancer - www-dep.iarc.fr/globocan). O melanoma é o sexto e sétimo tipo de câncer mais freqüente nos Estados Unidos entre homens e mulheres, respectivamente (Jemal A *et al.* 2008; Cho *et al.* 2010). Dados da National Cancer Institute Surveillance Epidemiology and End Results (SEER,

E.U.A.) estimam que 68.130 novos casos (38.870 homens e 29.260 mulheres) serão diagnosticados com melanoma, sendo que a estimativa de óbito é de 8.700 pessoas entre ambos os sexos em decorrência desta malignidade ao longo do ano de 2010 (www.seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html). Baseado nos dados do SEER de 2003 a 2007, a média de idade de pessoas com melanoma no momento do diagnóstico foi de 60 anos e a média de idade registrada nos óbitos foi de 68 anos. Em todo o mundo, durante o ano de 2008, houve 197.402 novos casos de melanoma com 46.090 mortes (International Agency for Research Cancer - www.dep.iarc.fr/globocan). Na Austrália, em muitos países europeus e na América do Norte, houve um aumento de cerca de 5% ao ano nos casos de melanoma no decorrer dos últimos 40 anos (Thompson *et al.*, 2005). Segundo a AIHW (Australian Institute of Health and Welfare - www.aihw.gov.au/cancer/data), a Austrália foi o país com maior incidência mundial de melanoma em homens (1:23) e o segundo em mulheres (1:35). No Brasil, segundo as estimativas do Instituto Nacional do Câncer para 2010, é esperado um total de 5.930 novos casos de melanoma entre homens e mulheres, com maior porcentagem na região sul do país (Instituto Nacional do Câncer - www.inca.gov.br). Cerca de 91,2% dos casos de melanoma afetam a pele, 5,3% os olhos, 2,2% apresentam local primário indeterminado e 1,3% afetam as mucosas, dos quais 55,4% ocorrem na região de cabeça e pescoço. Os melanomas primários da cavidade oral são raros e correspondem a menos de 1,2 casos em cada 10 milhões de pessoas por ano, afetando mais comumente o palato, seguido pela gengiva, mucosa jugal, lábios e rebordo alveolar (Hicks & Flaitz, 2000). Em estágios precoces da doença, seu crescimento é radial (horizontal) e em estágios avançados invasivo (vertical). O melanoma é tratado por excisão cirúrgica, tendo o índice de Breslow (distância em milímetros desde a camada nucleada mais superficial até o nível mais profundo de invasão) e de Clark (que correlaciona o nível anatômico de invasão associado ao índice mitótico) como importantes parâmetros prognósticos (Chin *et al.*, 1998; 2003; Younghoon *et al.*, 2010). O melanoma é um grave problema de saúde, não apenas pelo aumento mundial de sua incidência ou por afetar adultos jovens, mas pela seu alto potencial de gerar metastases e pela sua característica de ser pouco sensível à radioterapia e aos quimioterápicos atualmente conhecidos (revisado por

Li *et al.*, 2006; revisado por Ghosh e Chin, 2009). A sobrevida média para pacientes com lesões metastáticas é de 13,6% em 2 anos, 9,7% em 3 anos e apenas 2% em 5 anos (Lee *et al.*, 2000).

Os fatores de risco associados ao melanoma podem ser divididos em ambientais e relativos ao hospedeiro. O fator ambiental mais importante é a exposição à radiação UV, principalmente em pessoas de pele clara e com histórico de queimaduras solares recorrentes (Elwood *et al.* 1997; Rigel *et al.*, 2008; Cho *et al.* 2010). Além do mais, efeitos mutagênicos diretos no DNA, indução da produção de fatores de crescimento pelas células da pele, redução da imunidade e estimulação da produção de espécies reativas de oxigênio podem estar associados à etiologia dos melanomas (Elwood *et al.*, 1997; MacKie *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2005). Por outro lado, existem melanomas não associados aos raios UV, que se enquadram nos fatores de risco relativos ao hospedeiro, como histórico familiar, cor do cabelo e número de *nevus* pré-existentes (revisado por Li *et al.*, 2006; Cho *et al.* 2010). Dentre os aspectos genéticos associados à predisposição do melanoma, podemos citar genes que codificam proteínas controladoras do ciclo celular, como p16 (CDKN2A), localizado no cromossomo 9p21 e responsável pela expressão das proteínas p16^{INK4a} e p14^{ARF} (Walker *et al.*, 1998; Chin *et al.*, 2003). p16^{INK4a} é responsável pela inibição da formação do complexo enzimático CDK4/CDK6/ciclina D, necessário para a fosforilação da proteína Rb e entrada da célula na fase S do ciclo celular. p14^{ARF} tem como função estabilizar a proteína p53, prevenindo sua degradação mediada por HMD2 (human double minute 2). Na ausência de p14^{ARF}, a proteína HMD2 (uma ligase de ubiquitina específica para p53) conduz p53 a degradação pelos proteossomos (Kamijo *et al.*, 1998; Chin *et al.*, 2006). A alteração mais estudada entretanto é a mutação pontual (T1799A) no proto-oncogene BRAF, que é detectada em aproximadamente 65% dos indivíduos afetados por esta neoplasia (Chin *et al.*, 1998; Gray-Schopfer *et al.*, 2005; Garraway *et al.*, 2005; Hayward *et al.*, 2003; Pollock *et al.*, 2003). Outra alteração associada a etiologia do melanoma ocorre no gene CCND1, localizado no cromossomo 11q13 e responsável pela expressão da ciclina D1, que atua regulando positivamente o ciclo celular (Utikal *et al.*, 2005). Mutações nos genes que codificam as proteínas da família *ras* e as serina/treonina

quinases *raf*, o fator de crescimento de hepatócitos (HGF/SF) e seu receptor c-MET, assim como as proteínas supressoras tumorais PTEN, p53, p27^{Kip1} e p21 também já foram descritas em melanomas (Chin, 2003; Chudnovsky *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). Existem também, alterações nos receptores tirosina-quinase em vários tipos de câncer. Em melanomas são observadas alterações nos receptores de EGF (EGFR), MetRTK (c-MET) e Kit (c-KIT), resultando em mudanças na associação dos componentes de suas cascatas de sinalização (Ghosh e Chin, 2009). O EGFR pode ser ativado por EGF, TGF- α e anfiregulina, de forma a ativar as cascatas de sinalização de MAPK e PI3K. A amplificação do gene que codifica EGFR, localizado no cromossomo 7, foi observada em pacientes com estágio avançado desta doença (Koprowski *et al.*, 1985; Bastian *et al.*, 1998; Udart *et al.*, 2001). Apesar dos diversos progressos obtidos, uma melhor compreensão dos fatores ambientais e genéticos torna-se necessária para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas contra o melanoma.

2.2. Ácido graxo sintase (FASN)

FASN é um complexo enzimático multifuncional que possui sete sítios catalíticos e um grupo prostético 4'-fosfopanteteína, responsável pela síntese endógena de ácidos graxos saturados de cadeia longa a partir dos substratos de carbono acetil-CoA e malonil-CoA (Stoops & Wakil 1981; Tsukamoto *et al.*, 1983; Brink *et al.*, 2001; Chirala *et al.*, 2001; Rangan *et al.*, 2001; Smith *et al.* 2003; Baron *et al.*, 2004). Do ponto de vista estrutural, FASN é um homodímero formado por duas cadeias polipeptídicas longas, com massa molecular de aproximadamente 270 kDa. Os sete sítios catalíticos que compõem FASN estão distribuídos a partir da extremidade amino terminal em direção a carboxil terminal na seguinte ordem: β -cetoacil sintase, acetil-CoA e malonil-CoA transacilases, que funcionam como sítios de entrada dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA para a subsequente reação de condensação; na sequência, desidratase, enoil redutase, β -cetoacil redutase e proteína carregadora de acil, que atuam como redutores sobre o produto formado pela β -cetoacil sintase; e por fim, o sítio tioesterase, localizado na região carboxil terminal, que promove a hidrólise do palmitato que é

liberado como molécula recém sintetizada (Wakil, 1989; Jayakumar *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2003; revisado por Liu *et al.* 2010). A atividade de FASN é mínima em tecidos humanos normais, exceto em tecidos lipogênicos, uma vez que a maior parte dos ácidos graxos usados pelas células provém da dieta (Weiss *et al.*, 1986; Menendez *et al.*, 2005a). Sendo assim, a expressão de FASN é baixa ou mesmo ausente na maioria dos tecidos humanos adultos normais (Weiss *et al.*, 1986), com exceção de alguns tecidos lipogênicos tais como: fígado, tecido adiposo, mama durante a lactação, endométrio na fase proliferativa e pulmões de recém nascidos, para a produção da substância surfactante (Kuhajda, 2000; Chirala *et al.*, 2001).

Ao contrário, nas células malignas a maior parte dos ácidos graxos provém da síntese endógena, através da atividade de FASN. A expressão de FASN está aumentada em diversos tipos de neoplasias malignas humanas de natureza epitelial, como as de mama (Milgraum *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001a; Zhang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008), ovário (Alò *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001a), próstata (Swinnen *et al.*, 2002; Van de Sande *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2003; Shah *et al.*, 2006), endométrio (Pizer *et al.*, 1998; Tsuji *et al.*, 2004), tireóide (Vlad *et al.*, 1999), pulmão (Piyathilake *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002; Orita *et al.*, 2007; Orita *et al.*, 2008), cólon (Visca *et al.*, 1999; Ogino *et al.*, 2008), esôfago (Nemoto *et al.*, 2001), estômago (Kusakabe *et al.*, 2002), melanoma (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur, *et al.*, 2005; Kapur, 2005b), bexiga (Visca *et al.*, 2003) e carcinoma espinocelular bucal (Krontiras *et al.*, 1999, Agostini *et al.*, 2004, Silva *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008), bem como em sarcomas de tecidos moles (Takahiro *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2006). Está claro também na literatura científica que a alta expressão de FASN ocorre freqüentemente nos casos com pior prognóstico (Epstein *et al.*, 1995; Alo *et al.*, 1996; Gansler *et al.*, 1997; Kuhajda, 2000b; Little *et al.*, 2007; Horiguchi *et al.*, 2008; Ogino *et al.*, 2008). Provavelmente, a alta atividade desta via anabólica gera vantagens para o rápido crescimento das células tumorais (Baron *et al.*, 2004). Em melanomas, observou-se uma correlação direta entre a expressão de FASN e o índice de Breslow, além de uma correlação inversa entre FASN e a sobrevida total, indicando que a alta expressão de FASN

está associada a uma maior taxa de recorrência, maior risco de desenvolvimento de metástases e conseqüentemente pior prognóstico (Innocenzi *et al.*, 2003; Kapur *et al.*, 2005a; Kapur *et al.* 2005b).

Apesar das evidências apontando a síntese endógena de ácidos graxos como essencial para a proliferação de células malignas, não se conhece até o momento quais os mecanismos biológicos envolvidos. Neste contexto, Swinnen *et al.* (2003) demonstraram que a atividade de FASN é necessária para a produção dos fosfolipídios que compõe as membranas das células LNCaP (uma linhagem celular derivada de um adenocarcinoma de próstata metastático). Isto pode causar, além de um aumento na velocidade da produção das membranas celulares, alterações na sua composição lipídica com profundos efeitos em várias vias de transdução de sinais (Baron *et al.*, 2004). Em células neoplásicas, a maior parte dos ácidos graxos é proveniente da biossíntese endógena e independente da dieta (Sabine *et al.*, 1967; Ookhtens *et al.*, 1984; Weiss *et al.*, 1986; Menendez *et al.*, 2005a). Alterações metabólicas nas células malignas são sugeridas desde 1924, quando Warburg & Posener observaram um aumento da glicólise anaeróbica (Kuhajda *et al.*, 2006). Somente em 1953 foi descrito que a síntese de ácidos graxos estava aumentada em tecidos neoplásicos, em comparação com os tecidos normais (Medes *et al.*, 1953). A regulação da expressão de FASN em tumores malignos começou a ser intensamente investigada a partir da década de 80, em linhagens celulares derivadas de câncer de mama. Chalbos *et al.* (1987) demonstraram que o tratamento com progestinas leva a um aumento tanto da expressão como da atividade de FASN em células de câncer de mama (MCF7 e T47D). De maneira semelhante, o tratamento com andrógenos aumenta a expressão de FASN em linhagens celulares derivadas de câncer de mama e próstata (Chambon *et al.*, 1989; Swinnen *et al.*, 1997). Kumar-Sinha *et al.* (2003) demonstraram, em células derivadas da glândula mamária, genes diferencialmente regulados por ErbB2. Através de experimentos de “microarrays”, estes autores observaram uma conexão direta entre o gene que codifica a FASN e ErbB2, através da via PI-3K, que tem ação direta sobre o promotor da FASN. Segundo estes autores, a inibição da atividade da FASN em linhagens celulares

derivadas de câncer de mama causa apoptose preferencialmente nas células que estão expressando grandes quantidades de ErbB2. Menendez *et al.* (2004) mostraram que FASN regula a expressão e atividade deste mesmo receptor de superfície em linhagens celulares de câncer de mama e de ovário. Estes mesmos autores demonstraram que a inibição de FASN causa diminuição dos níveis de ErbB2 e leva a um aumento dos níveis de PEA-3, um fator de transcrição com atividade inibitória sobre o promotor de ErbB2 em células SK-Br3, derivadas de câncer de mama (Menendez *et al.*, 2005). Recentemente, Lee *et al.* (2009) demonstraram que a inibição de FASN com a substância amentoflavona, extraída de uma planta medicinal chinesa (*Selaginella tamariscina*), promove apoptose e reduz a proliferação de células derivadas da linhagem de câncer de mama SK-Br3. Apesar de não se conhecer os mecanismos pelos quais a inibição de FASN atinge as células malignas, promovendo apoptose e reduzindo a proliferação celular *in vitro* e diminuindo o número de metástases *in vivo* (Menendez *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009), foi sugerido que o acúmulo do metabólito intermediário malonil-CoA possa induzir a morte por apoptose (Pizer *et al.*, 2000). Além do mais, estudos com siRNAs revelaram que a inibição de FASN dispara o gatilho de apoptose em linhagens celulares derivadas de câncer de próstata e mama, o que parece não acontecer nas células normais (Brusselmans *et al.*, 2005; Chajes *et al.*, 2006). Entretanto, novas pesquisas serão necessárias para que se possa compreender qual o verdadeiro papel da inibição da enzima FASN sobre as células neoplásicas e quais vias metabólicas envolvidas na carcinogênese.

2.3. Inibidores de FASN

2.3.1. Cerulenina

A cerulenina ([2R, 3S] -2,3 epoxi-1-oxo-7, 10 trans, transdodecadienamida) é um produto natural do fungo *cefalosporium caerulens* descoberto por Hata *et al.* (1960a, b) por suas propriedades antifúngicas. Somente em 1972, Nomura & Vance demonstraram seu efeito como inibidor específico da síntese de ácidos graxos (Omura, 1976; Pizer *et al.*, 1996b). Esta droga inibe de forma irreversível a atividade da enzima FASN através de ligação covalente ao sítio ativo β -cetoacil sintase, responsável pela reação de condensação dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA (Kuhajda *et al.*, 2000). Entretanto, a instabilidade da molécula de cerulenina em experimentos com animais tem limitado sua utilização como agente anti-lipogênico (Omura, 1976).

2.3.2. C75

C75 é um análogo sintético da cerulenina, formado por uma cadeia de 7 carbonos (α -metileno- γ -butirolactona) e que possui os mesmos efeitos inibitórios sobre a atividade de FASN com a vantagem de ser mais estável e, portanto, ter melhor efeito “in vivo” (Kuhajda *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001). Loftus *et al.* (2000) demonstraram que o tratamento sistêmico, via intraperitoneal, de camundongos C57BL/60laHsd-lep^{ob} e BALB/c com cerulenina ou C75 provoca redução da quantidade de alimento ingerida e significativa perda de peso, sendo necessária uma única dose de C75 para que a quantidade de alimento ingerido pelos animais diminua mais do que 90% nas primeiras 24 horas. Este trabalho sugere que a atividade de FASN seja importante para a regulação da quantidade de alimento ingerido pelos animais, podendo representar um alvo terapêutico para o tratamento da obesidade. Tanto a cerulenina como o C75 produzem significativa inibição da progressão do ciclo celular, bloqueando a passagem da fase G0/G1 para a fase S em linhagens celulares derivadas de neoplasias malignas humanas (Pizer *et al.*, 1996; Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1998; Kuhajda, 2000; Li *et al.*,

2001; De Schrijver *et al.*, 2003). A inibição da atividade de FASN causa ainda, em células malignas, um aumento na taxa de morte por apoptose (Li *et al.*, 2001). Menendez *et al.* (2004) demonstraram, num estudo com linhagens derivadas de câncer de mama e ovário, que a inibição de FASN com cerulenina ou C75 leva a uma diminuição da expressão da oncoproteína ErbB2. O tratamento com estes inibidores de FASN causa também a redução no tamanho de tumores em modelos xenográficos (Pizer *et al.*, 1998; Pizer *et al.* 2000). Nestes trabalhos, os autores injetaram células derivadas de câncer de ovário humano (OVCAR-3) no peritônio de camundongos *nude* e observaram tumores de tamanho menor nos animais tratados com cerulenina ou C75 (Pizer *et al.*, 1998). Os mesmos autores (Pizer *et al.*, 2000) relataram uma marcante redução da síntese de ácidos graxos e do tamanho dos tumores, além de aumento da taxa de apoptose em camundongos que receberam implantes subcutâneos de células derivadas de câncer de mama (MCF7), após tratamento com C75. Gabrielson *et al.* (2001) demonstraram efeito semelhante em modelo xenográfico de mesotelioma, com células H-Meso. Alli *et al.* (2005) demonstraram que camundongos transgênicos *neu-N*, que super-expressam ErbB2 e desenvolvem câncer de mama espontaneamente, tiveram uma significativa diminuição na incidência dos tumores quando tratados com C75. Segundo estes autores, apenas 20% dos camundongos tratados desenvolveram carcinoma de mama, em comparação com 50% dos animais do grupo controle. Estes últimos resultados sugerem um efeito quimiopreventivo da inibição farmacológica de FASN no câncer de mama.

2.3.3. Orlistat

A droga Orlistat (Xenical®), aprovada pela FDA para emagrecimento, é um derivado semi-sintético da lipstatina que inibe irreversivelmente as lipases gástricas e pancreáticas no interior do trato gastrointestinal (Guercioli *et al.*, 1997) e que atua também como um inibidor específico de um dos sítios catalíticos da FASN (tioesterase). A inibição de FASN com Orlistat tem propriedades anti-tumorais e anti-proliferativas em um modelo xenográfico de câncer de próstata e

em linhagens tumorais derivadas de câncer de próstata e mama (Kridel *et al.*, 2004; Knowles *et al.*, 2004). O sítio tioesterase é um dos sete sítios catalíticos que compõem a enzima FASN, sendo responsável pela liberação das moléculas recém sintetizadas de palmitato. Menendez *et al.* (2004, 2005c) demonstraram que o tratamento das linhagens celulares derivadas de carcinoma de estômago (NCI-N87) e de mama (SK-Br3) com Orlistat causou, além da inibição da síntese de ácidos graxos, um bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1, evitando a entrada na fase S. Além do mais, o Orlistat inibiu intensamente a expressão de ErbB2 através da estimulação da proteína PEA-3, responsável pela sua transcrição, e aumentou os níveis de p27^{Kip1}, levando as células a apoptose.

2.3.4. Outros inibidores

Triclosan (5-cloro-2-[2,4-diclorofenoxi]fenol) é uma substância com propriedades anti-sépticas utilizada na formulação de sabonetes, dentrífcios e enxaguatórios bucais, que possui atividade inibitória sobre a atividade de FASN na região do domínio enoil-redutase (Liu *et al.*, 2002). Lu e Archer (2005) demonstraram que 43,3% dos animais (Sprague-Dawley) tratados com triclosan (1000 ppm) desenvolveram carcinoma de mama através da injeção intraperitoneal do carcinógeno N-metil-N-nitrosourea (MNU), em comparação com 70% dos animais pertencentes ao grupo controle, os quais não receberam a droga. Outra substância que tem sido descrita como inibidora de FASN é a EGCG (epigallocatequina-3-galato), que é um componente do chá verde e tem atividade comparável a da cerulenina e do C75 por bloquear a FASN no sítio β -cetoacil sintase (Wang e Tian, 2001). Puig *et al.* (2008) demonstraram que a utilização desta substância *in vitro* promoveu apoptose e causou diminuição nos níveis de ErbB2, PI3K e ERK em linhagem celular de câncer de mama. Recentemente, a amentoflavona foi descrita por Lee *et al.* (2009) como tendo propriedades apoptóticas e anti-proliferativas em linhagem celular humana derivada de carcinoma mamário (SK-BR-3), por inibir a atividade de FASN.

Mesmo que promissores, os estudos que visam a inibição farmacológica de FASN como uma forma de quimioterapia para o tratamento do

câncer devem ser interpretados com muito cuidado. O bloqueio de FASN *in vivo* pode causar efeitos colaterais como anorexia e perda de peso (Clegg *et al.*, 2002), além de apresentar potencial efeito teratogênico (Chirala *et al.*, 2003). Além do mais, um estudo do nosso grupo demonstrou que cerulenina é capaz de inibir o crescimento de fibroblastos humanos normais em culturas primárias (Almeida *et al.*, 2005), sugerindo que a atividade de FASN não seja essencial apenas para as células malignas.

2.4. Metaloproteases de Matriz (MMPs) e Câncer

A degradação da matriz extracelular é essencial para processos fisiológicos como desenvolvimento, crescimento e reparo tecidual. Por outro lado, a proteólise excessiva tem um papel importante em diversas condições patológicas, como artrite reumatóide, osteoartrite, desordens auto-imunes, doença periodontal e câncer (Cauwe *et al.* 2007; Chaudhary *et al.* 2010). As MMPs formam uma família de endopeptidases dependentes de zinco, responsáveis pela degradação da matriz extracelular tanto em situações fisiológicas como patológicas, contribuindo para eventos como invasão e metástase em lesões malignas de cabeça e pescoço (Chaudhary *et al.* 2010) . Até o presente momento, 23 MMPs humanas foram clonadas e caracterizadas (Vihinen *et al.* 2002, Egeblad *et al.* 2002, Hofmann *et al.* 2005, Lemaitre, 2006; Quesada *et al.* 2009). De acordo com suas respectivas estruturas e especificidade aos substratos, as MMPs são classificadas em: collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas, MMPs de membrana e outras MMPs. Normalmente, a expressão dos genes que codificam as MMPs é baixa, sendo modulada por fatores fisiológicos e/ou patológicos como citocinas, fatores de crescimento, hormônios e oncoproteínas (Westermarck & Kähäri, 1999).

Dentre as MMPs mais estudadas estão, collagenase 1 (MMP-1), 2 (MMP-8), 3 (MMP-13) e 4 (MMP-18), capazes de clivar colágenos fibrilares (I, II, III e V), cujos fragmentos são posteriormente degradados pelas gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9). A degradação do colágeno tipo IV pelas MMPs -2 e -9 é crucial para a invasão das células do melanoma, que também expressam MMP -1, -2, -9,

-13 e MT1-MMP, além dos inibidores TIMP-1, -2 e -3 (Hofmann *et al.*; 2000; Pasco *et al.* 2004). De acordo com Väisänen (1999), o aumento da expressão de MMP-2 em melanomas está correlacionado com metástases hematogênicas. Além do mais, tem sido demonstrada uma correlação entre o aumento da expressão de MMP-1, -2 e -9 e um pior prognóstico para os pacientes portadores desta neoplasia, independentemente dos níveis de Clark e Breslow (Väisänen, 1999; Wollina *et al.* 2001; Nikkola *et al.* 2005). O papel das MMPs na evolução de diversas neoplasias humanas (como por exemplo os de mama, cólon, pulmão, cabeça e pescoço, boca e melanoma) tem sido objeto de inúmeras pesquisas nas últimas décadas. Por exemplo, Itoh *et al.* (1998) observaram que o implante subcutâneo de células B16-BL6 em camundongos C57BL/6J *knockout* para gelatinase A (MMP-2) retardou a progressão do tumor e reduziu a angiogênese. Segundo Pepper (2001), a expressão elevada de MMP-2 em melanomas está correlacionada ao aumento da quantidade da integrina $\alpha V\beta 3$ e de MT1-MMP, que por sua vez ativa MMP-2 e favorece a angiogênese. Zhang *et al.* (2006) observaram, em modelo animal de câncer oral, que os níveis de mRNA e da proteína MMP-2 estão elevados durante o desenvolvimento do tumor, sendo mais altos nas metástases em linfonodos cervicais. Em trabalho realizado por nosso grupo, foi verificado que a atividade de MMP-2 e -9 está aumentada em pacientes portadores de câncer de boca, sugerindo que esta pode ser útil no acompanhamento das recorrências de câncer bucal (Yorioka *et al.* 2002). Sun *et al.* (2007) demonstraram que a hipóxia, induzida através de ligadura da artéria femoral de camundongos C57BL6, causa aumento da expressão de HIF-1 α e de VEGF em tumor provocado pela injeção intramuscular de células B16F10, o que foi associado a um aumento na angiogênese. No mesmo estudo, houve correlação positiva entre as MMPs -2 e -9 e VEGF, sugerindo que o melanoma, em condições de hipóxia, promove o aumento de HIF-1 α , que favorece a angiogênese para conseguir um maior aporte de sangue e que estas MMPs potencializam a invasão. De fato, diversos autores têm associado o aumento de MMPs a angiogênese, invasão e metástase em neoplasias malignas humanas, dentre as quais o melanoma (Itoh *et al.* 1998; Westermarck & Hähäri 1999; Hofmann *et al.* 2005; Pepper 2006; Sun *et al.* 2007; Ria *et al.* 2010).

2.5. Integrinas e Câncer

As células interagem com a matriz extracelular (ECM) através das integrinas, que são receptores de superfície responsáveis pela adesão celular. Integrinas são glicoproteínas transmembrânicas heterodiméricas formadas pelas subunidades α (150 a 180 kDa) e β (~90 kDa). A associação de diferentes subunidades α e β produz integrinas distintas. Até o presente momento, são conhecidos vinte e cinco diferentes tipos de integrinas, sendo oito as subunidades β e 18 as subunidades α (Kuphal *et al.* 2005). De forma genérica, as subunidades α e β se ligam entre si de forma não covalente, sendo que cada subunidade possui domínios extracelulares, intracelulares e transmembrânicos (Rathinam *et al.* 2010). As integrinas se ligam aos substratos através da sequência RGD (que compreende os resíduos de arginina, glicina e ácido aspártico) encontrada em moléculas que compõem a ECM (Xiong *et al.* 2002). Elas atuam como moduladores bidirecionais, sendo que a via externa-interna ativa cascatas de transdução de sinais intracelulares que regula a expressão de diversos genes responsáveis pelos mecanismos de proliferação, polarização, crescimento e migração. Por outro lado, a via interna-externa controla a afinidade de adesão da superfície celular em relação aos componentes do meio extracelular (Dedhar & Hannigan, 1996; Giancotti & Ruoslahti, 1999; Kuphal *et al.*; 2005; Rathinam *et al.* 2010). Foi relatado por Kuphal *et al.* (2005) que certas integrinas (α IIb β 2, α 2 β 1, α 4 β 1, α V β 3) têm expressão elevada em melanomas, principalmente a α V β 3, o que também foi demonstrado em carcinomas espinocelulares bucais (Ramos *et al.* 1997). Esta última está associada à mobilidade celular no melanoma, sendo a porção citoplasmática da subunidade β essencial para o processo de migração (Filardo *et al.* 1995). Montgomery *et al.* (1994) demonstraram um efeito anti-apoptótico da integrina α V β 3 na linhagem celular M21, derivada de melanoma humano. Além do mais, a expressão desta integrina na superfície de células de melanoma está envolvida na migração transendotelial, essencial para o processo metastático (Voura *et al.* 2001).

Habermann *et al.* (2002) implantaram linhagens celulares derivadas de melanoma humano (M21) *knockout* para a integrina α V β 3 na veia caudal de

camundongos BALB/c nude e demonstraram reduzido número de metástases experimentais para os pulmões, em comparação com a linhagem controle. Além do mais, animais tratados com anticorpos anti- $\alpha V\beta 3$ tiveram maior tempo de sobrevida, o que sugere uma participação ativa desta integrina nos processos de migração celular e metástase. Nip *et al.* (1992) demonstraram, através do implante subcutâneo de células derivadas de metástase linfática de melanoma humano (MeWo) em camundongos (CD-1)Br *nude*, que a adesão das células neoplásicas aos vasos linfáticos é mediada pela integrina $\alpha V\beta 3$. De forma semelhante, Hieken *et al.* (1995) demonstraram através de imuno-histoquímica em amostras de melanoma de 76 pacientes, dos quais 23 apresentavam metástase linfática, que todos os 23 casos metastáticos eram positivos para a integrina $\beta 1$ e que nenhum paciente com marcação negativa para $\beta 1$ apresentou metástase linfática durante o período de acompanhamento (87 meses). Esta observação sugere que a integrina $\beta 1$ tenha participação na disseminação metastática de melanomas humanos. Em estudos pré-clínicos, a inibição farmacológica das integrinas $\alpha V\beta 3$ e $\alpha V\beta 5$ reduziu a angiogênese e o crescimento tumoral e, em estudos clínicos, o uso de inibidores de integrinas apresentou baixa toxicidade e boa tolerabilidade, sendo estudados em combinação com radioterapia e quimioterapia (Alghisi & Rüegg, 2006). Em contraste as evidências científicas da participação das integrinas nas metástases hematogênicas, poucas informações estão disponíveis sobre o papel destas no processo de disseminação linfática (Dietrich *et al.*, 2007).

Guo *et al.* (2006) demonstraram a interação entre a integrina $\beta 4$ e ErbB2, o qual, como mencionado anteriormente é regulado pela atividade de FASN. Através de um modelo animal, estes autores compararam os tumores mamários gerados pela introdução de uma mutação na integrina $\beta 4$ de camundongos (MMTV-NeuYD/ $\beta 4^{1355T/1355T}$) e seus respectivos controles (MMTV-NeuYD/ $\beta 4^{WT}$) e observaram que os animais mutados para integrina $\beta 4$ produziram tumores menores em menor quantidade. Segundo estes autores, a interação entre a integrina $\beta 4$ e ErbB2 amplifica a sinalização de ErbB2 e facilita a progressão do tumor mamário nos animais avaliados.

Apesar de inúmeras pesquisas sugerirem efeitos positivos para a inibição da biosíntese de ácidos graxos e da expressão de integrinas e MMPs em modelos experimentais, estudos pré-clínicos e até mesmo clínicos (Pizer *et al.*, 1998; Kuhajda 2000; Pizer *et al.* 2000; De Schrijver *et al.* 2003; Knowles *et al.*, 2004; Trika *et al.*, 2004; Raguse *et al.*, 2004; Tsopanoglou *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2004, 2005; Kapur *et al.*, 2005; McNeel *et al.*, 2005; Ouyang 2006; Alghisi & Rüegg, 2006; Ko *et al.*, 2007), nenhum estudo abordou até o momento os possíveis efeitos da inibição de FASN na expressão de integrinas e MMPs, bem como na atividade destas últimas. Resultados de nossa dissertação de mestrado (Proc. FAPESP nº 05/52631-8) demonstraram que o bloqueio de FASN reduziu em cerca de 50% as metástases experimentais induzidas pelo implante intraperitoneal de células B16F10 em camundongos C57BL6, gerando tumores primários com consistência mais amolecida e aparentemente mais dispersos no abdômen, além de possuírem menor capacidade metastática, indicando possíveis alterações na capacidade adesiva das células tumorais. Por este motivo, resolvemos investigar a possível participação da inibição de FASN sobre certas MMPs e integrinas na linhagem B16F10.

3. OBJETIVOS

1. Avaliar o efeito da inibição de FASN com Orlistat na colonização pulmonar por células de melanoma murino (B16F10) inoculadas na via caudal de camundongos isogênicos C57BL6.
2. Avaliar o efeito do Orlistat sobre a expressão das integrinas $\alpha\beta3$ e $\alpha5\beta1$ em células B16F10.
3. Avaliar o efeito do Orlistat sobre a expressão e a atividade de MMP -2 e -9 em células B16F10.
4. Avaliar o efeito da inibição de FASN sobre a adesão das células de melanoma B16F10 às macromoléculas da matriz extracelular laminina e fibronectina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultura de células. A linhagem B16F10, derivada de um melanoma de camundongo, foi adquirida da ATCC (American Type Culture Collection, CRL-6475) e está armazenada no Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Patologia da FOP/UNICAMP. Neste trabalho, estas células foram cultivadas em frascos de 75 cm² e placas de 24 poços (NUNC, Dinamarca) em meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen, E.U.A.) suplementado com 2% ou 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Brasil) e solução antibiótica e antimicótica (Invitrogen) na diluição de 1:100, a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

4.2. Preparo das soluções de Orlistat. Para a aplicação em camundongos, o composto ativo do Orlistat (Xenical[®], Roche, Suíça) foi extraído de acordo com Knowles *et al.* (2004), dissolvendo-se o conteúdo de uma cápsula em 1ml de etanol a 33% em PBS, seguido de agitação por 30 minutos a temperatura ambiente. A seguir, a solução foi centrifugada a 16.000 xg por 5 minutos e o sobrenadante coletado e armazenado a -80°C até o momento do uso. Para o uso em experimentos de cultura celular, o mesmo protocolo foi seguido, entretanto, etanol absoluto foi utilizado para dissolver o conteúdo das cápsulas do medicamento.

4.3. Ensaios zimográficos. Foram plaqueadas 3,5X10⁵ células B16F10 na presença de 2% SFB e após 24 horas o meio de cultura foi substituído por meio fresco com 2% SFB e Orlistat (nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500µM) ou ETOH. Depois de 24 horas, 70µl do meio condicionado de cada condição experimental foi coletado para a realização dos zimogramas e misturado com tampão de amostra não redutor contendo 2% de SDS, 125 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10% de glicerol e 0,001% azul de bromofenol. A seguir, as amostras foram separadas em géis de poliacrilamida a 10% co-polimerizados com 1,6 mg/ml de gelatina (Sigma, E.U.A.). Após a eletroforese, os géis foram lavados sob agitação

suave (2 banhos de 20 minutos cada a temperatura ambiente) em solução aquosa de Triton-X100 a 2% (Gibco Life Technologies BRL, E.U.A) para remoção do SDS e conseqüente renaturação das MMPs. Em seguida, os géis foram incubados em tampão de ativação contendo 50 mM de Tris-HCl pH 7,4 e 5 mM de CaCl_2 a 37°C por 16 horas e a atividade gelatinolítica detectada após coloração com comassie blue R-250 a 0,05% (BioRad). As bandas negativas visualizadas nos zimogramas foram densitometradas e número de células de cada ensaio foi obtido com o objetivo de se normalizar a atividade gelatinolítica. Os resultados foram também normalizados pela concentração de DNA obtido de cada *pellet* celular.

4.4. Ensaio de adesão. Para cada experimento, foi sensibilizada uma placa de 24 poços com BSA a 5%, laminina ou fibronectina a 10µg/ml pelo período de 16 horas a 4°C. Células B16F10 ($3,5 \times 10^5$) foram incubadas por 16 horas em meio RPMI 1640 com 2% de SFB, e 250 ou 500 µM de Orlistat ou seu diluente ETOH. Foi realizado também o tratamento das células B16F10 ($3,5 \times 10^5$) com meio RPMI 1640 com 10% de SFB adicionado de cerulenina a 5µg/ml ou seu diluente DMSO. Após o período de incubação as células foram tripsinizadas, contadas e plaqueadas (2×10^5 células por poço das placas sensibilizadas) mantendo-se os respectivos tratamentos por mais 2 horas a 37°C. Após transcorrido este tempo as células foram cuidadosamente lavadas com PBS a 37°C (7 a 10 vezes) e as células que permaneceram aderidas foram fixadas com formaldeído tamponado a 10% por 15 minutos e coradas com azul de toluidina (Sigma). Depois de lavadas com água destilada para remoção do excesso do corante, as células foram incubadas por 15 minutos a 37°C com 200µl de uma solução de SDS a 1% (Gibco) e a densidade óptica dos sobrenadantes analisada em um aparelho leitor de ELISA, no comprimento de onda de 655 nm (Bio-Rad Ultramark Microplate Imaging System, E.U.A.).

4.5. Modelo animal para o estudo de metástases experimentais de melanoma. Sessenta e oito camundongos C57BL6 (número total de animais dos experimentos realizados em triplicata), com cerca de 8 semanas de vida, foram obtidos junto ao CEMIB-UNICAMP e mantidos em gaiolas apropriadas,

alimentados com ração comercial Labina (Purina, Brasil) e providos de água *ad libitum*. Os animais ficaram em sala climatizada, com controle automático de iluminação, alternando períodos claros e escuros a cada 12 horas. Em cada experimento, foram realizados implantes intravenosos nas veias caudais laterais de células B16F10 (2×10^5) suspensas em 100 μ l de PBS. Depois de 24 horas das inoculações, deu-se início ao tratamento com 60 μ l da solução de Orlistat (o que corresponde a 240mg/kg/dia – via i.p.) até o 21º dia. Os animais dos grupos controle receberam injeções somente do veículo (solução contendo 33% etanol em PBS). Aproximadamente no 21º dia após os implantes das células, todos os animais foram sacrificados pela inalação de CO₂ e imediatamente dissecados, sendo os pulmões coletados e fixados em solução de Bouin. Foi então realizada a contagem macroscópica das colônias pulmonares utilizando-se de lupa estereoscópica (Nikon A100) em aumento de 25X e a documentação realizada com câmera digital e lente macro 120 mm (Nikon Medical). Os tecidos foram incluídos em parafina e os cortes histológicos de 5 μ m obtidos corados com H&E.

4.6. Imunofluorescências. Foram realizadas reações de dupla marcação através de imunofluorescência com anticorpos primários anti- α -V (Chemicon) e anti- β -3 (Santa Cruz), além de marcação simples com anticorpos primários anti- α 5 β 1 (Chemicon). Para cada experimento, foram sensibilizadas lâminas para cultura celular com oito poços (Lab Tek, Nunc) com laminina ou fibronectina a 10 μ g/ml em PBS pelo período de 16 horas a 4°C. Após o período de sensibilização das lâminas, células B16F10 ($1,5 \times 10^4$) foram semeadas em meio RPMI 1640 com 2% de SFB, após 24 hs este meio de cultura foi removido cuidadosamente e substituído por meio RPMI 1640 com 2% SFB e 250 μ M de Orlistat ou seu diluente ETOH. Após 24 horas do tratamento, o meio de cultura foi delicadamente removido e as células fixadas em etanol a 70% por 15 minutos. As lâminas foram então lavadas três vezes com PBS (10 minutos cada). Após o bloqueio com a solução *Animal Free Blocker* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, E.U.A.) por 1 hora, as células foram incubadas com anticorpos anti- β 3 (1:200) diluídos em *Animal Free Blocker* por 1 hora a temperatura ambiente. Depois de três lavagens com PBS (10 minutos cada) foi feita a incubação com anticorpos

secundários conjugados com texas red (1:200) diluídos no mesmo tampão, por 1 hora a temperatura ambiente. A seguir, após novas lavagens em PBS, foi realizado outro bloqueio seguido da incubação com os anticorpos anti- α V (1:200) diluídos em PBS 1% BSA por 1 hora a temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas novamente com PBS e incubadas com anticorpos secundários conjugados com fluoresceína (FITC, 1:200) diluídos em PBS 1% BSA por 1 hora a temperatura ambiente. Depois de novas lavagens, as lâminas foram montadas em meio de montagem VECTASHIELD com DAPI (Vector Laboratories). Para realização das marcações simples, lâminas para cultura celular com oito poços (Lab Tek, Nunc), previamente sensibilizadas com 10 μ g/ml de laminina ou fibronectina, receberam $1,5 \times 10^4$ células B16F10 suspensas em 0,2 ml de meio RPMI com 10% de soro fetal bovino em cada poço. Após 24 horas do plaqueamento, o meio de cultura foi removido e as células fixadas em etanol 70% a temperatura ambiente por 15 minutos. As lâminas foram então lavadas três vezes com PBS (10 minutos cada). A incubação com anticorpos primários anti- $\alpha 5\beta 1$ (1:100) diluídos em PBS 1% BSA ocorreu por 1 hora a temperatura ambiente. A seguir, após três novas lavagens com PBS foi realizada incubação com os anticorpos secundários conjugados com FITC (1:100) diluídos em PBS 1% BSA por 1 hora. Após nova série de lavagens com PBS, as lâminas foram montadas com meio de montagem vectashield com DAPI. As observações foram feitas num microscópio Leica modelo DMR em aumento de 400X e as imagens adquiridas com o auxílio do programa Leica Application Suite, versão 2.8.1. e as imagens em confocal foram obtidas com o aparelho LEICA TCS SP5 – Leica Microsystems.

4.7. Estatística. Para a comparação entre o número de metástases presentes nos animais controle e tratados com orlistat e para os ensaios de adesão foi utilizado o teste *t* de Student, considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Zimogramas

Para a realização dos zimogramas, células B16F10 foram tratadas com Orlistat (ou seu solvente ETOH) nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 μ M por 24 horas. Após este período, os sobrenadantes foram coletados e as células de cada condição experimental tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer. Em seguida, realizou-se o ensaio zimográfico de acordo com o descrito em Materiais e Métodos. Os géis provenientes dos ensaios zimográficos foram digitalizados (Figuras 1 e 2), as imagens adquiridas com auxílio do programa Molecular Analyst (Bio-Rad, E.U.A) e as bandas densitometradas e normalizadas pelo número de células presente em cada amostra (Figuras 3 e 4). Com o objetivo de realizar uma normalização adicional àquela feita pelas contagens celulares (Figuras 5 e 6), o DNA destas células foi extraído e a DO obtida usada como fator normalizador (Figura 7). O exame direto das bandas negativas correspondentes as áreas de degradação da gelatina incorporada nos géis sugere uma muito discreta redução da atividade das MMPs -2 e -9 à medida que a concentração de Orlistat aumenta. Entretanto, isto foi provavelmente decorrente da redução no número de células, pois esta droga inibe o crescimento e provoca apoptose nas células B16F10 (Carvalho *et al.* 2008). No entanto, após a normalização dos resultados tanto pelo número de células presentes em cada condição experimental como pela concentração de DNA de cada *pellet* celular, constatamos que não houve inibição da atividade enzimática (Figuras 5, 6 e 7). Este fato foi observado em todos os ensaios zimográficos realizados (7 experimentos independentes), pois não ocorreram diferenças significativas do ponto de vista estatístico ($p > 0,005$) entre as células tratadas com Orlistat e seus controles, no período estudado (24 horas).

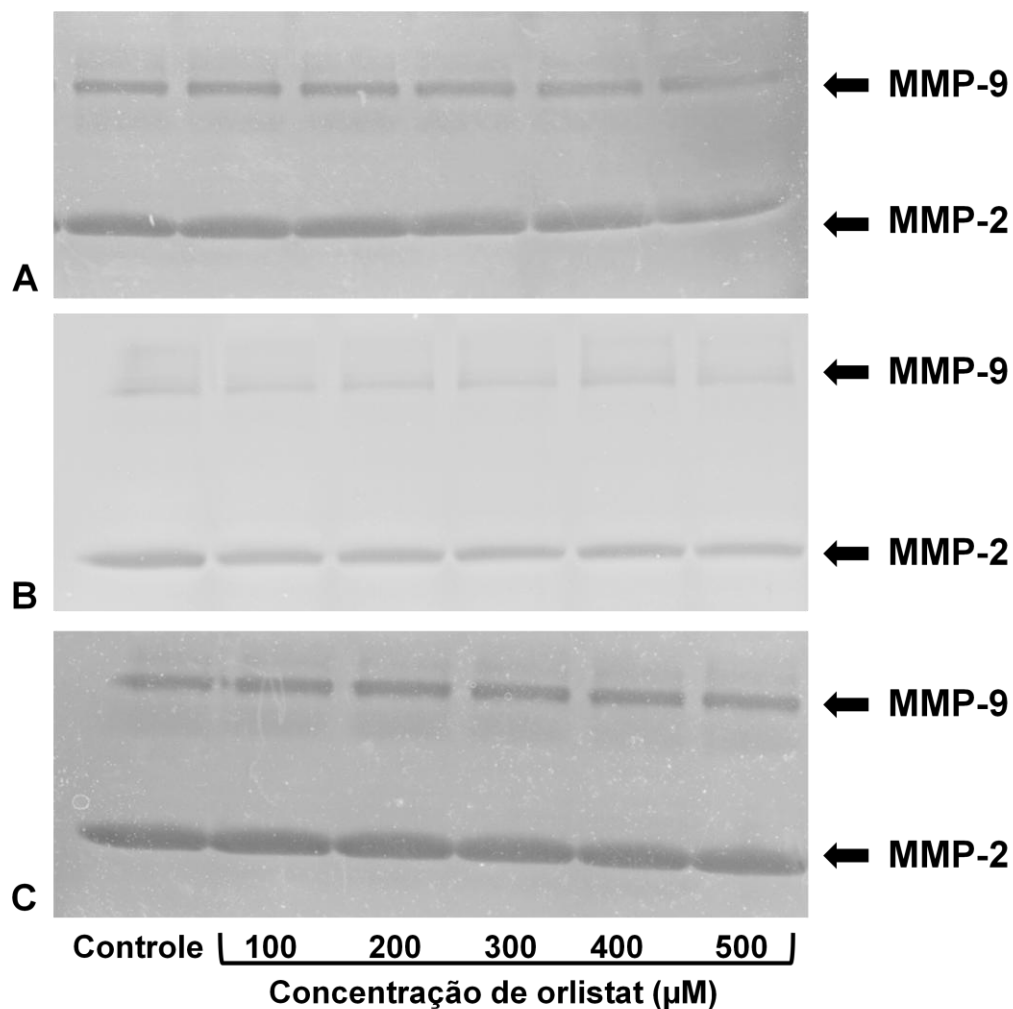


Figura 1. Ensaios zimográficos realizados de forma independente (A, B e C). Note que as bandas estão positivas para facilitar a análise densitométrica. Pode-se observar uma discreta diminuição da atividade de MMP-2 e -9, principalmente a partir da concentração de 400 μM de Orlistat.

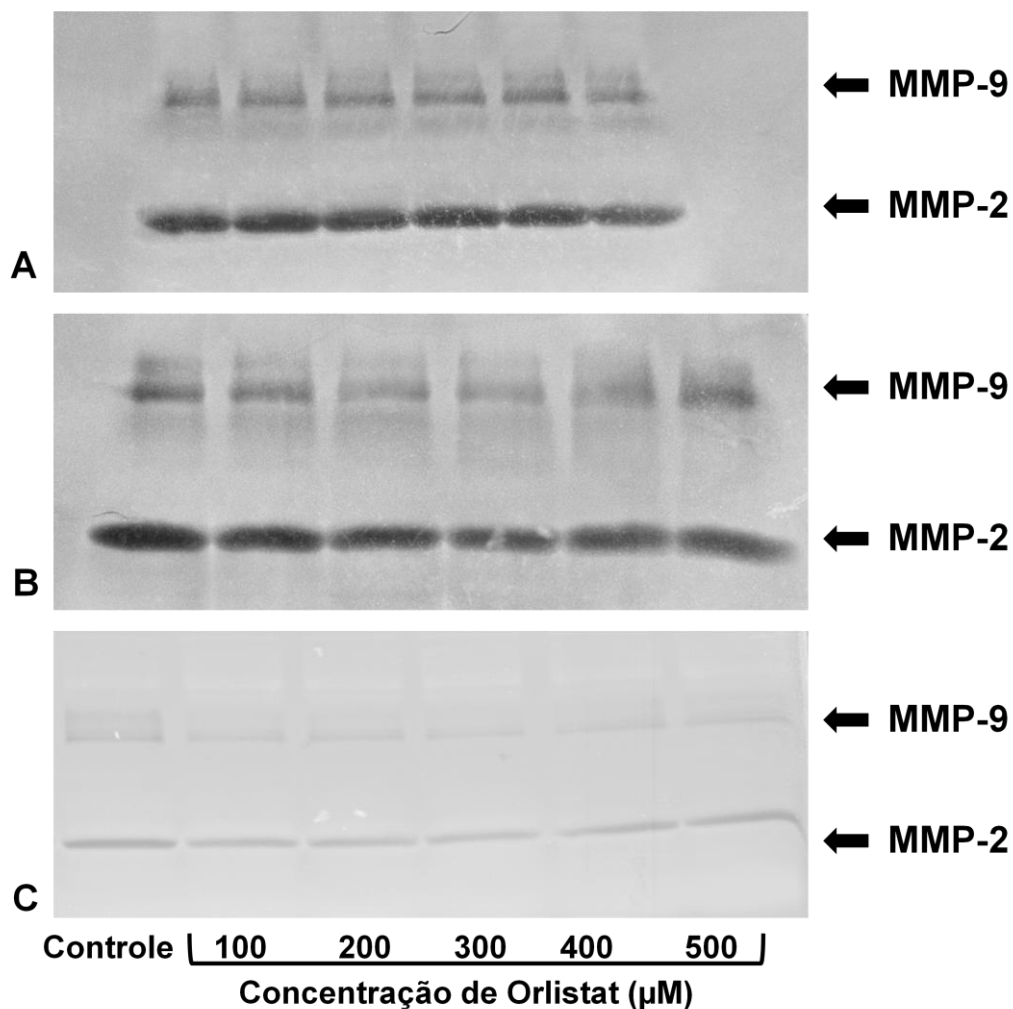


Figura 2. Ensaio zimográfico realizado de forma independente (A, B e C). Podemos notar uma discreta diminuição das atividades gelatinolíticas de MMP-2 e -9 em B e C. Os *pellets* de cada condição experimental foi utilizado para extração de DNA e normalização dos resultados.

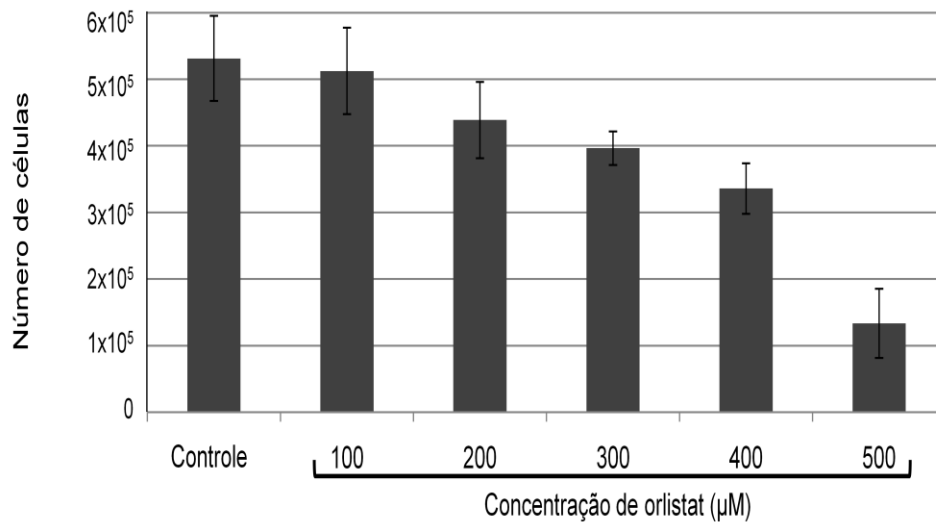


Figura 3. Médias do número de células presentes nos frascos de cultura no momento da coleta do meio condicionado dos 3 primeiros zimogramas (mostrados na figura 1). Nota-se acentuada diminuição do número de células, principalmente nas concentrações de orlistat superiores a 200 µM.

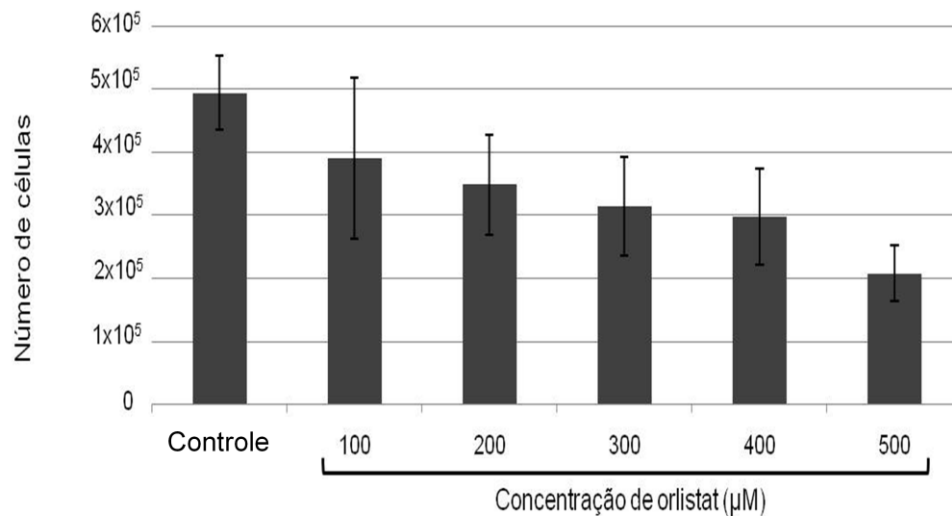


Figura 4. Médias do número de células presentes nos frascos de cultura no momento da coleta do meio condicionado para 4 zimogramas dos quais a extração de DNA foi também realizada (três destes experimentos são mostrados na Figura 2). Nota-se acentuada diminuição do número de células, principalmente nas concentrações de Orlistat superiores a 300 µM.

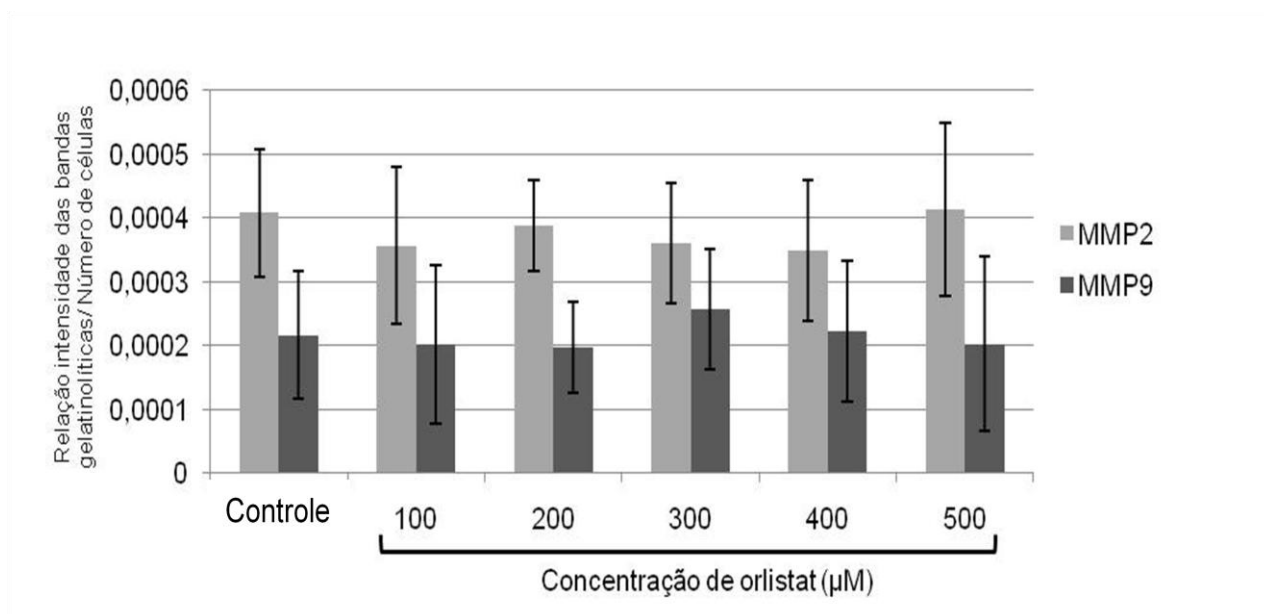


Figura 5. Atividade gelatinolítica dos 3 primeiros zimogramas realizados após a normalização pelo número de células presentes no momento da coleta do meio. Observa-se que não houve alteração em MMP-2 e -9 no período de 24 horas.

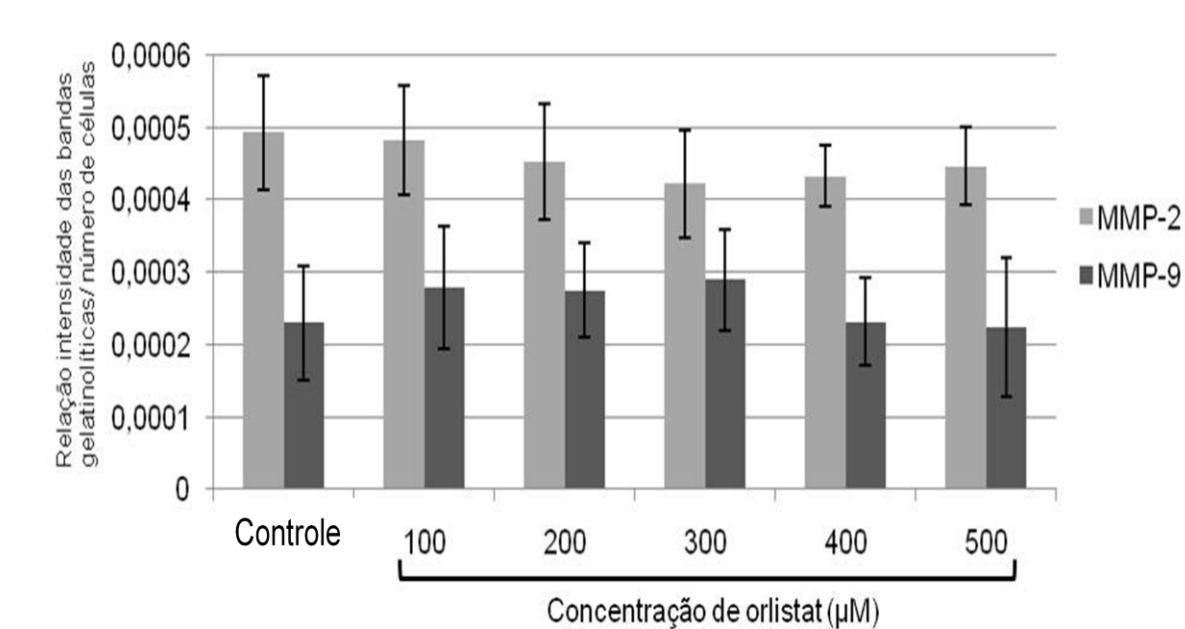


Figura 6. Atividade gelatinolítica após a normalização pelo número de células de cada condição experimental dos 4 ensaios zimográficos utilizados para normalização pela concentração de DNA. Não houve alteração na atividade de MMP-2 e -9 no período de 24 horas, como nos experimentos anteriores (Figura 5).

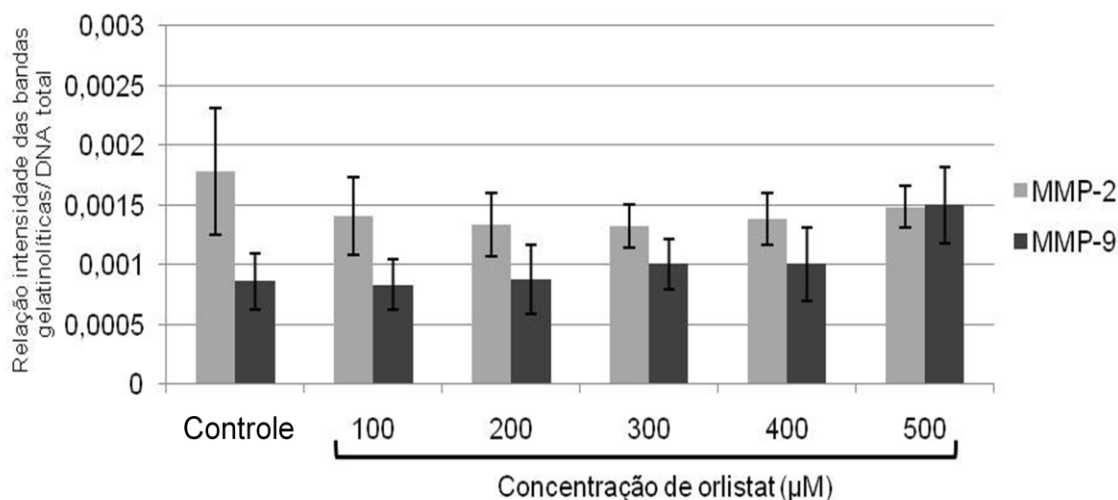


Figura 7. Atividade gelatinolítica após a normalização pela concentração de DNA extraído dos *pellets* celulares de cada condição experimental (dos 4 ensaios zimográficos mostrados na Figura 2). Não houve alteração na atividade de MMP-2 e -9 no período de 24 horas, como nos experimentos anteriores (Figuras 5 e 6).

5.2. Avaliação do efeito do tratamento com Orlistat ou cerulenina na adesão de células B16F10

No intuito de verificar o efeito da inibição de FASN com orlistat ou cerulenina sobre a adesão das células B16F10 a componentes da matriz extracelular, foram realizados ensaios de adesão, sobre fibronectina ou laminina. Nos experimentos com laminina, houve aumento na adesão das amostras tratadas com 250 μM de Orlistat, em comparação ao seu controle ETOH (Figura 8, $p < 0,02$). Aumento similar ocorreu quando utilizou-se a cerulenina para o tratamento das células, em comparação com seu controle DMSO (Figura 9, $p < 0,001$).

Nos ensaios realizados para testar o efeito dos inibidores de FASN sobre a adesão das células B16F10 sobre a fibronectina, também observamos uma tendência de aumento da adesão com 5 μg/ml de cerulenina (Figura 11, $p < 0,001$). Ao contrário dos resultados observados nos ensaios com laminina, o tratamento com 250 μM de Orlistat não apresentou diferença estatística significativa com fibronectina (Figura 10, $p > 0,05$). A concentração de 500 μM de Orlistat produziu um forte efeito inibidor da adesão das células B16F10 tanto à laminina como à fibronectina, após as 16 horas de tratamento. Isto é

provavelmente resultado de alterações metabólicas intensas e morte celular, visto que nossos experimentos anteriores (Carvalho *et al.* 2008) mostraram altas taxas de apoptose.

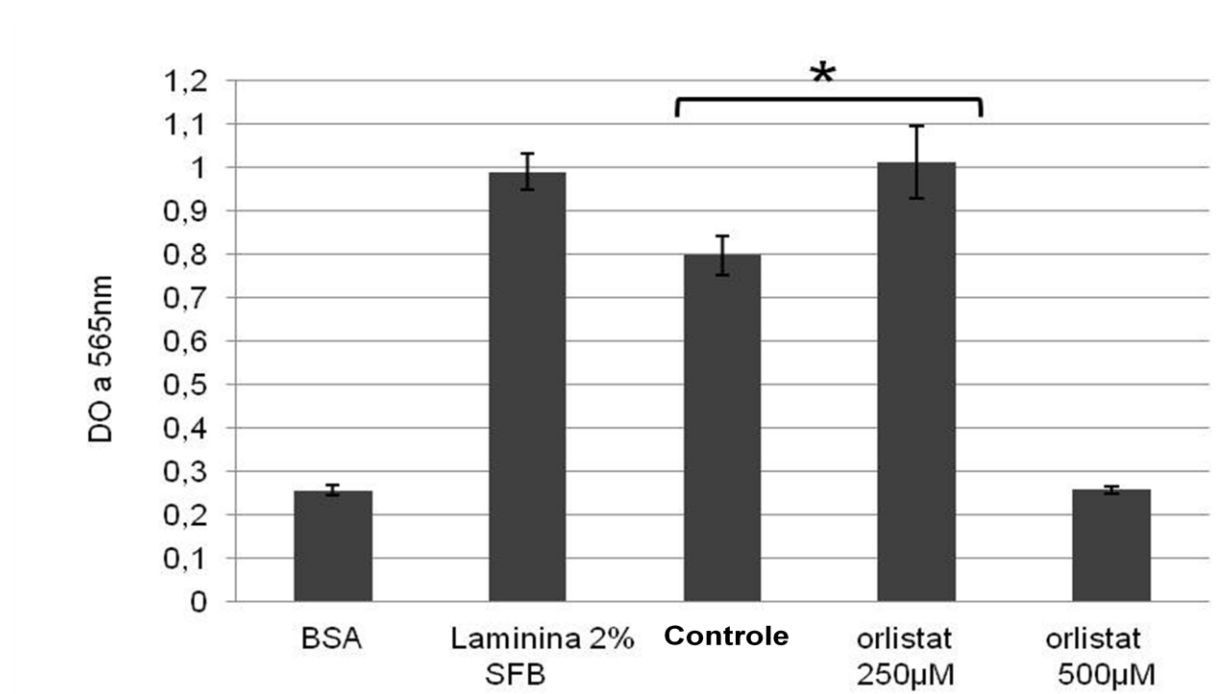


Figura 8. Ensaios de adesão das células B16F10 tratadas com orlistat sobre laminina. Observa-se um aumento da adesão de células B16F10 tratadas com 250 µM de orlistat (teste *t*, $p < 0,02$), em relação ao controle ETOH. Por outro lado, nota-se uma forte inibição da adesão de células B16F10 quando tratadas com 500µM de orlistat (teste *t*, $p < 0,001$). BSA representa os controles negativos e Laminina 2% representa os controles positivos. Os resultados mostrados provêm de 3 experimentos independentes.

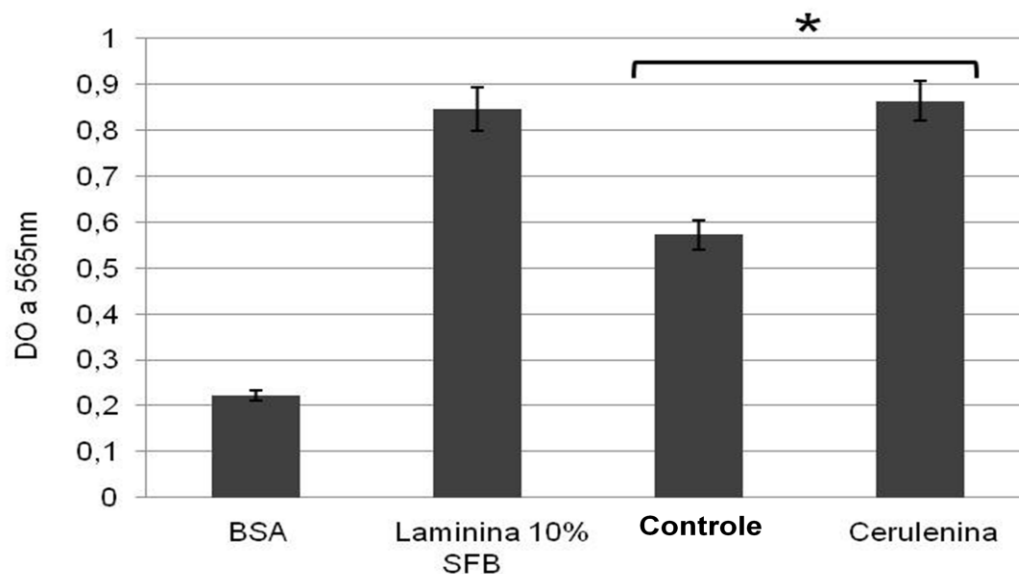


Figura 9. Ensaios de adesão das células B16F10 tratadas com cerulenina sobre laminina. Nota-se aumento da adesão das células B16F10 nas amostras tratadas com 5 µg/ml de cerulenina (teste *t*, $p < 0,001$), em relação ao controle DMSO. BSA indica os controles negativos e laminina 10% SFB os controles positivos. Os resultados provêm de 3 experimentos independentes.

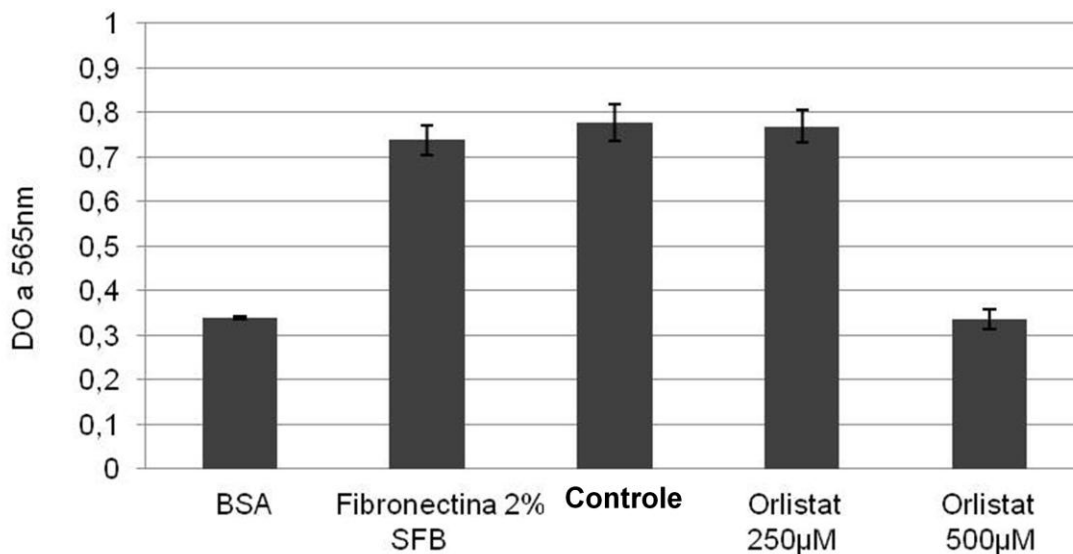


Figura 10. Efeito do Orlistat sobre a adesão das células B16F10 à fibronectina. Observa-se que o tratamento com 250µM de orlistat não alterou a adesão de células B16F10 (teste *t*, $p > 0,05$), em comparação com o controle ETOH. Porém, uma forte inibição da adesão das células B16F10 tratadas com 500µM de orlistat foi observada (teste *t*, $p < 0,001$). BSA indica os controles negativos e Fibronectina 2% os controles positivos. Os resultados provêm de 3 experimentos independentes.

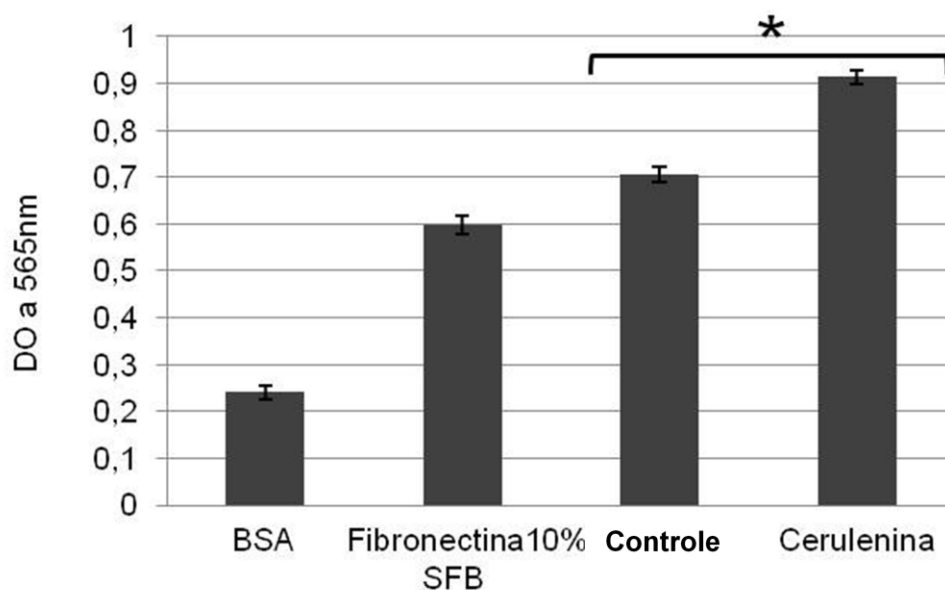


Figura 11. Efeito da cerulenina sobre a adesão das células B16F10 à fibronectina. Nota-se aumento da adesão das células B16F10 na amostra tratada com 5 µg/ml de cerulenina (teste *t*, $p < 0,001$), em comparação ao controle DMSO. BSA indica os controles negativos e Fibronectina 10% SFB os controles positivos. Os resultados provêm de 3 experimentos independentes.

5.3. Avaliação do efeito da inibição de FASN em modelo animal para o estudo de metástases experimentais de melanoma

Após a fase de padronização do modelo experimental de metástases (ou colonização pulmonar) através da injeção de células de melanoma na veia caudal lateral, foram realizados 3 experimentos independentes como descrito em Materiais e Métodos. No total, foram utilizados 68 animais, sendo 34 tratados com orlistat e 34 com ETOH (controles) pelo período de 21 dias. Não foram notadas alterações físicas ou comportamentais nos camundongos durante o tratamento com orlistat ou ETOH, durante todo período experimental. Os animais foram sacrificados no 21º dia, quando então foram coletados os pulmões, os quais foram fixados em solução de Bouin para realização da contagem macroscópica das colônias de células de melanoma. Foram encontrados, no grupo controle, uma média de 153 colônias pulmonares por animal, ao passo que no grupo tratado foram encontradas 71 colônias por animal (Tabela 1 e Figura 12). O índice de

animais com colônias pulmonares presentes em ambos os grupos chegou a 90%. Após diversas repetições, adotou-se como critério de inclusão a presença de pelo menos uma colônia pulmonar por animal. Em todas as avaliações macroscópicas, as colônias presentes na superfície pulmonar foram facilmente identificadas e contadas.

Nos estudos microscópicos, foram detectados numerosos grupos de células de melanoma em crescimento com diversas figuras de mitose e distribuídas por todo o parênquima pulmonar, com extensas áreas de necrose e redução significativa dos espaços alveolares (Figura 13). Outro achado interessante foi a presença de colônias no coração de um dos animais (Figura 14) utilizados na padronização do modelo animal, na região de átrio direito. Este fato não era esperado devido a alta pressão sanguínea neste compartimento, o que demonstra o alto poder de colonização desta linhagem celular.

Tabela 1. Achados macroscópicos dos experimentos de metástases experimentais em animais C57BL6 tratados* ou não com orlistat. O resultado foi estatisticamente significativo nos 3 experimentos (teste *t*, $p < 0,005$).

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Total
Nº Animais	9	13	12	11	34
Controle					
Nº Colônias	1019	2204	1998	1740	5221
Nº Animais	8	13	13	11	34
Tratado					
Nº Colônias	608	1038	773	807	2419*

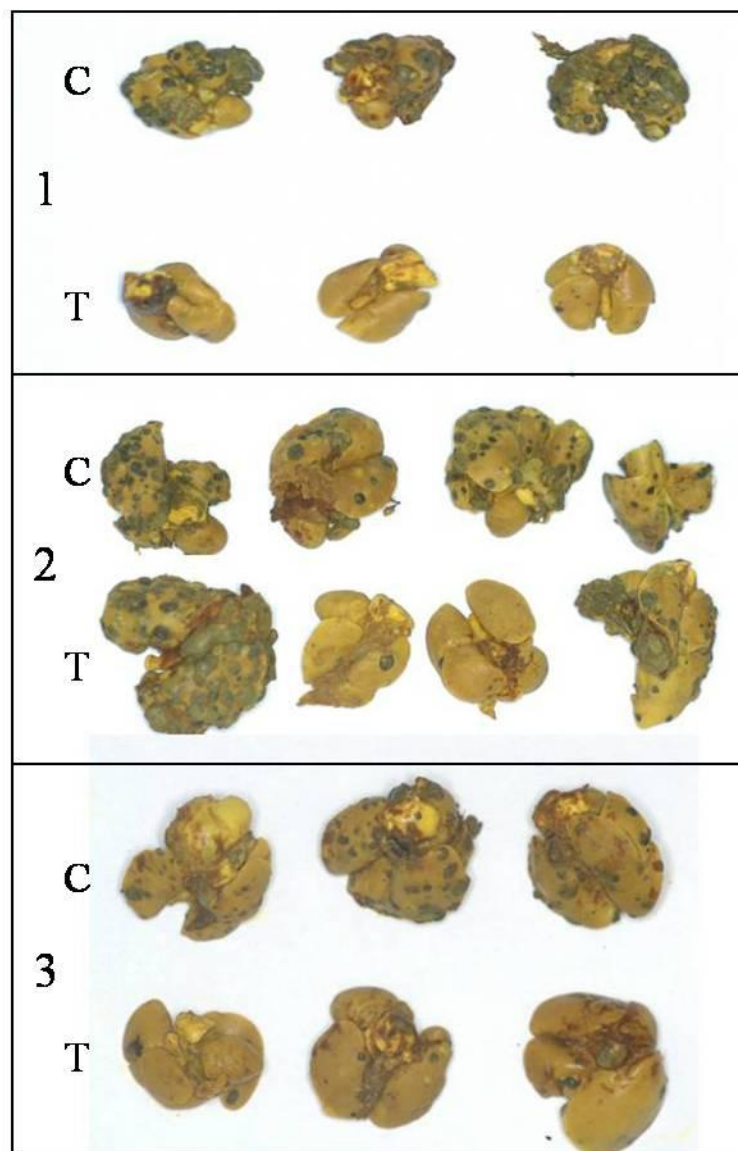


Figura 12. Aspectos macroscópicos de pulmões representativos dos 3 experimentos de metástases experimentais. Os números 1, 2 e 3 indicam os três experimentos independentes. Nas linhas assinaladas com C (grupos controle) podemos observar a presença de colônias metastáticas nodulares, distribuídas por toda superfície pulmonar, com tonalidades variando de cinza escuro a negro e de tamanhos muito variados. Note que nas linhas marcadas com a letra T (grupos tratados), ocorreu uma nítida diminuição do número de nódulos presentes na superfície dos pulmões.

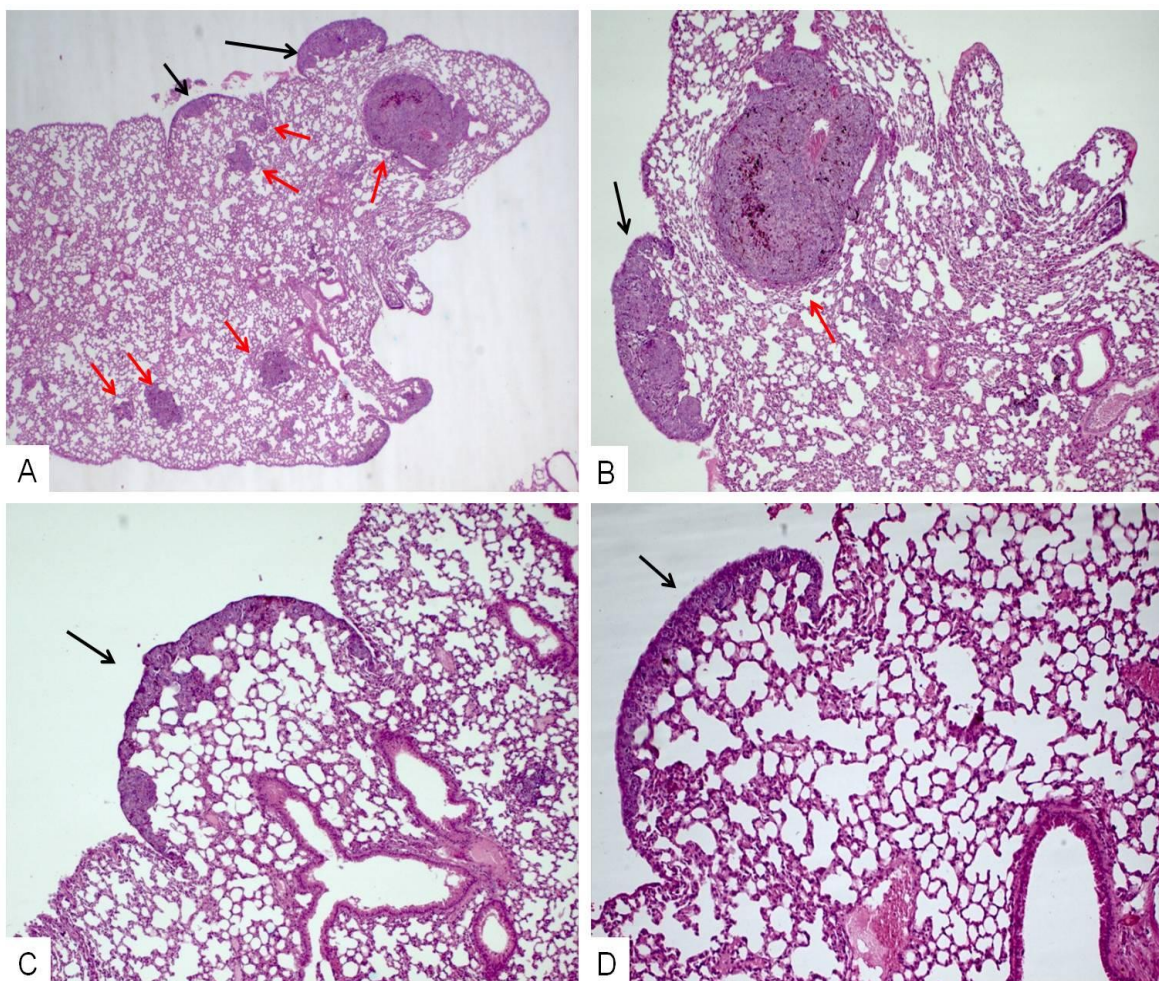


Figura 13. Aspectos microscópicos dos pulmões com colônias de células de melanoma B16F10. Podemos observar em A, B, C e D os nódulos metastáticos na porção mais periférica dos pulmões (setas pretas), os quais foram contados com auxílio de lupa estereoscópica (Tabela 2). Note em A, a presença de múltiplos focos metastáticos espalhados por todo o parênquima pulmonar (setas vermelhas). Em B pode-se observar o crescimento tumoral provocando o estreitamento dos alvéolos pulmonares (setas vermelhas). Aumentos originais: A, 25X; B, 50X; C e D 100X. Coloração H&E.

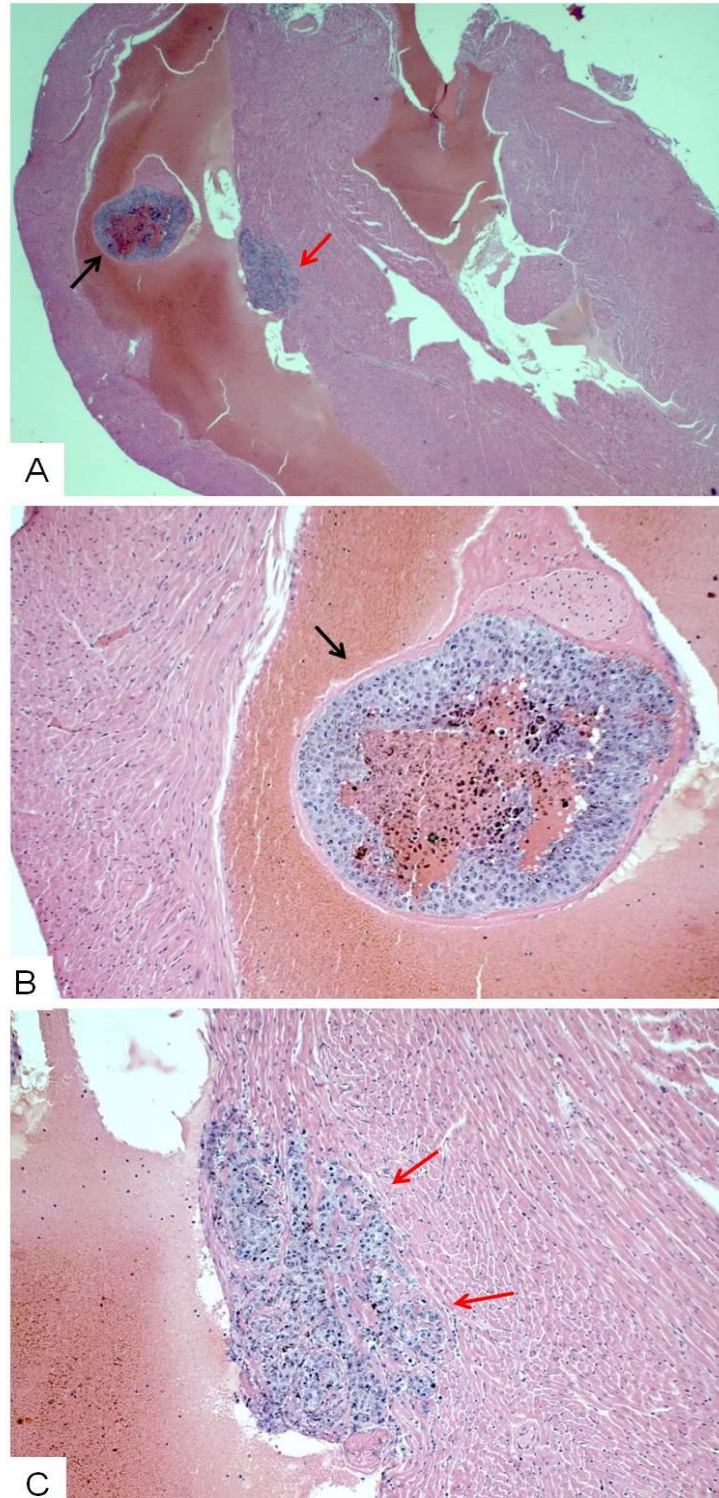


Figura 14. Aspectos microscópicos de crescimento metastático no coração. Em A, e B notamos um foco metastático de melanoma localizado no átrio direito, de formato arredondado e com presença de necrose em seu interior (setas pretas). Observamos em A e C células neoplásicas invadindo a parede do átrio direito e destruindo células musculares cardíacas (setas vermelhas). Aumentos originais: A, 25X; B, 100X e C, 100X; Coloração H&E

5.4. Ensaios de imunofluorescência para localização das integrinas $\alpha\beta3$ e $\alpha5\beta1$

Para avaliar a presença das integrinas $\alpha\beta3$ e $\alpha5\beta1$ nas células B16F10, estas foram marcadas com anticorpos fluorescentes. Nos ensaios de dupla marcação em células aderidas sobre superfícies tratadas com fibronectina, foi possível observar marcação fluorescente correspondendo às cadeias α (Figura 15 B) e $\beta3$ (Figura 15 C) na periferia celular. Na Figura 15 A, podemos notar o núcleo celular corado com DAPI e na figura 15 D a composição das imagens A, B e C. Nos controles negativos não ocorreu marcação, demonstrando a especificidade da reação (Figura 17). Na Figura 16 B, pode-se observar uma forte marcação para a integrina α em célula B16F10 cultivada sobre laminina (seta) e na Figura 16 C a positividade para as integrinas $\beta3$. A Figura 16 D mostra a composição das imagens A, B e C, sugestiva da presença do dímero $\alpha\beta3$. Em todos os nossos experimentos de imunofluorescência, observamos que as células se aderiram e se espalharam mais rapidamente nas superfícies tratadas com laminina, em comparação com a fibronectina, porém, não houve diferença nas imunomarcações. Da mesma forma, realizamos marcações para a integrina $\alpha5\beta1$ em células B16F10 cultivadas sobre laminina ou fibronectina. Como pode ser observado na Figura 18 B, ocorreu marcação sugestiva de membrana celular na grande maioria das células aderidas à fibronectina. A Figura 19 mostra a marcação para as mesmas integrinas nas células B16F10 aderidas sobre a laminina. Não houve marcação nos controles negativos. Foram realizadas também, imunofluorescências para as integrinas $\alpha\beta3$ sobre laminina (Figura 20 A, B e C) ou fibronectina (Figura 21 A, B e C), utilizando-se da microscopia confocal para uma maior riqueza de detalhes (Confocal LEICA TCS SP5 – Leica Microsystems). Na figura 20 A, podemos observar a marcação para a integrina α (FITC), enquanto na Figura 20 B, observamos a marcação para a integrina $\beta3$ (Texas Red). Na Figura 20 C, podemos notar a composição das imagens A e B. Após a padronização dos experimentos de imunofluorescência para localização das integrinas $\alpha\beta3$, foram realizados ensaios para avaliar o efeito da inibição de FASN sobre a expressão das integrinas $\alpha\beta3$ cultivadas sobre

laminina. Na Figura 22, em A, B e C podemos observar regiões sugestivas de locais de adesão focal (setas), que correspondem as integrinas $\alpha v\beta 3$ em células B16F10 controles positivos tratadas com ETOH (fotomicrografias de 3 experimentos independentes). A Figura 23 (A, B e C) mostra ausência de marcação nos controles negativos sem anticorpos primários e tratadas com o diluente ETOH. O tratamento das células B16F10 com 250 μ M de orlistat pelo período de 16 horas inibiu a marcação das regiões de adesão focal com anticorpos contra as integrinas $\alpha v\beta 3$ (Figura 24, representativa de 3 experimentos independentes). Como esperado, notamos na Figura 25 em A, B e C a ausência de marcação das regiões focais de adesão nos controles negativos (ausência de anticorpos primários e tratamento com orlistat) Em todas as Figuras as letras A, B e C são representativas de 3 experimentos independentes.

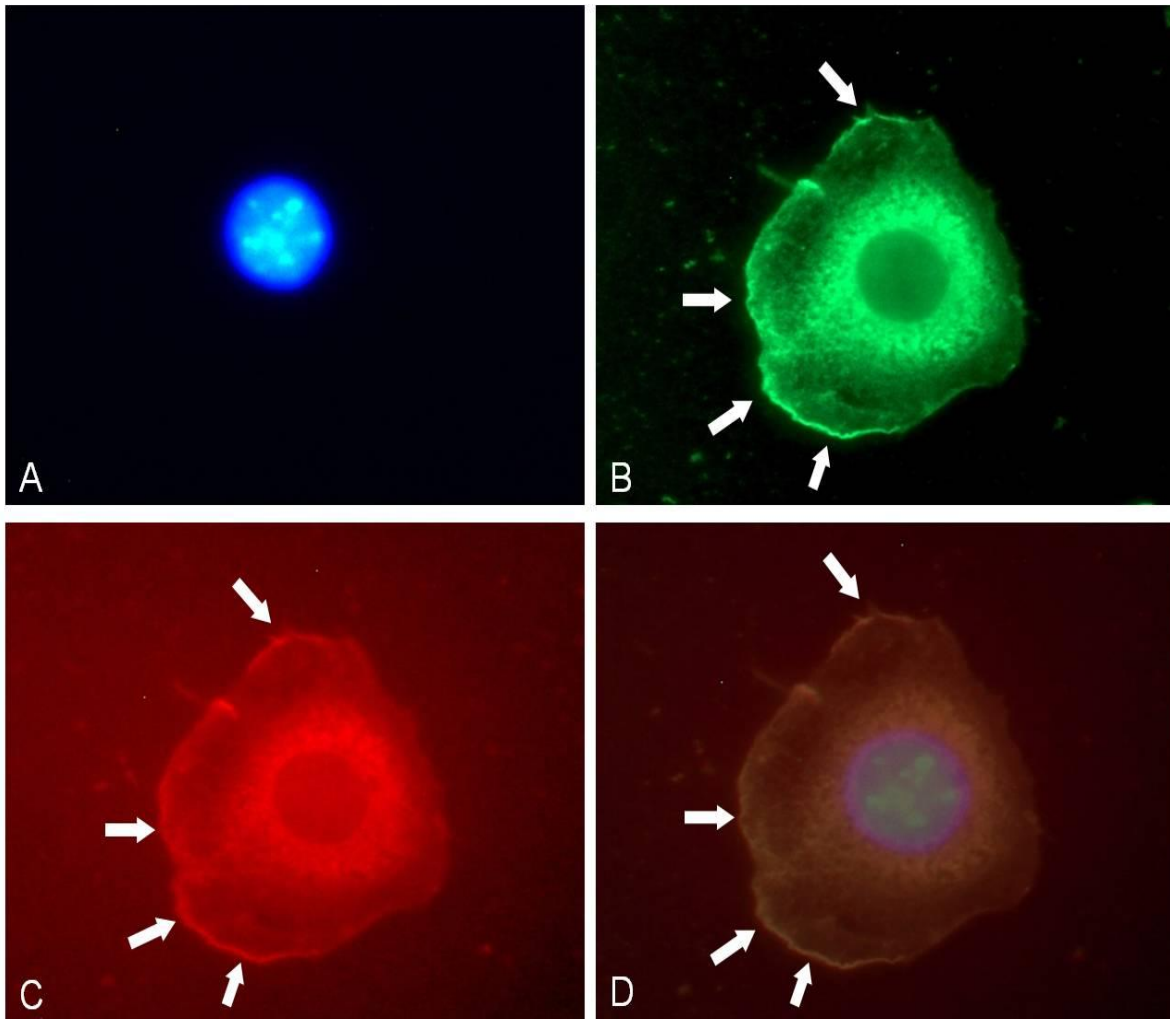


Figura 15. Imunofluorescência por dupla marcação em células B16F10 cultivadas sobre fibronectina. Podemos notar em A, a marcação do núcleo por DAPI; em B, a marcação na membrana celular com FITC (setas), correspondendo as integrinas α_v . Em C pode-se observar marcação em vermelho (Texas Red) para as cadeias β_3 na superfície da mesma célula (setas). A fotomicrografia mostrada em D revela a sobreposição das imagens B e C com co-localização de α_v e β_3 (setas). Aumento original 400X.

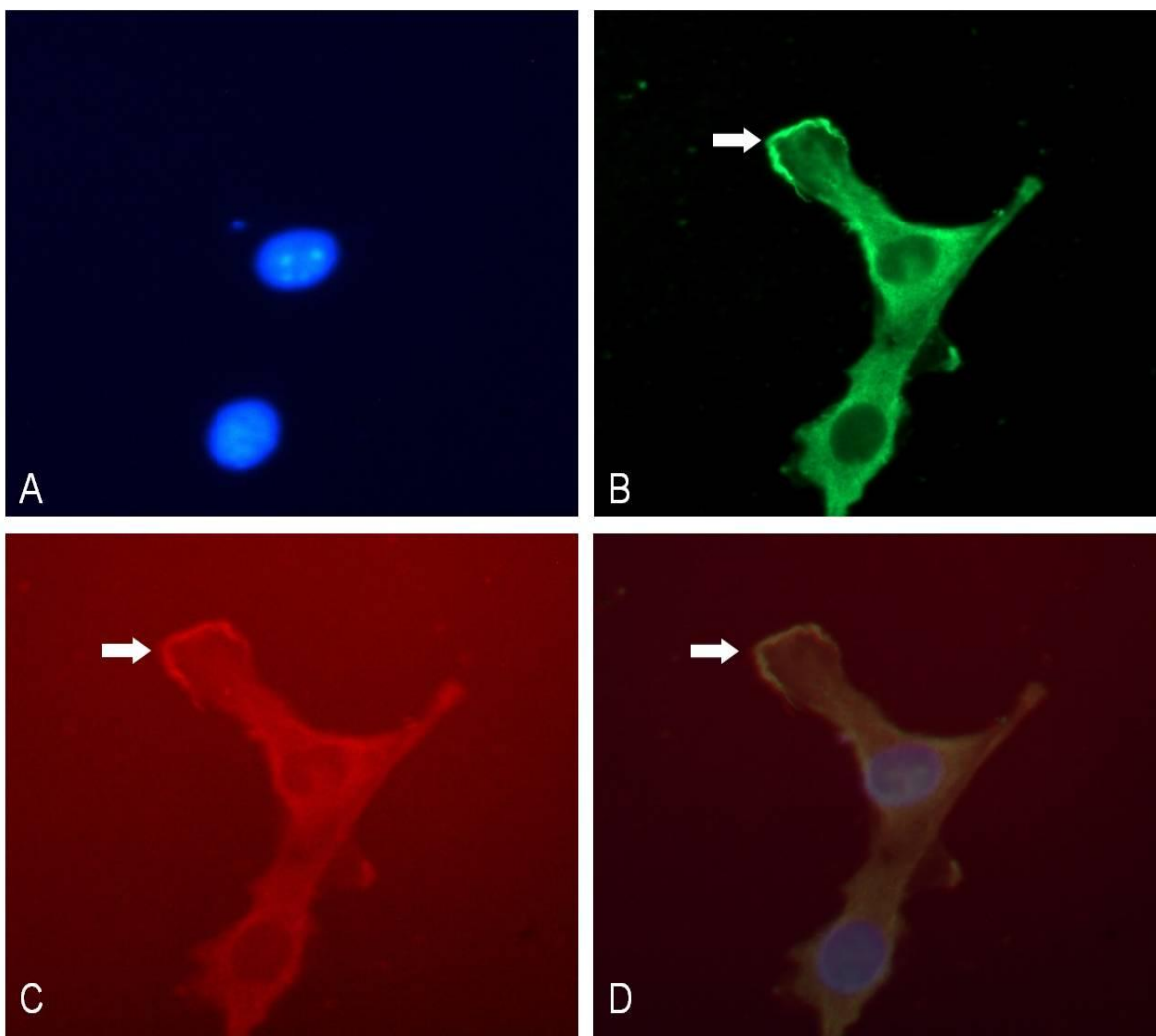


Figura 16. Imunofluorescência por dupla marcação em células B16F10 plaqueadas sobre laminina. Podemos notar em A, a coloração dos núcleos com DAPI, em B a marcação da membrana celular de coloração verde (FITC), correspondendo às cadeias αV (seta). Em C observa-se a marcação em vermelho (Texas Red) para cadeias $\beta 3$, na mesma região da membrana celular. A fotomicrografia D revela a sobreposição das imagens A e B. Aumento original 400X.

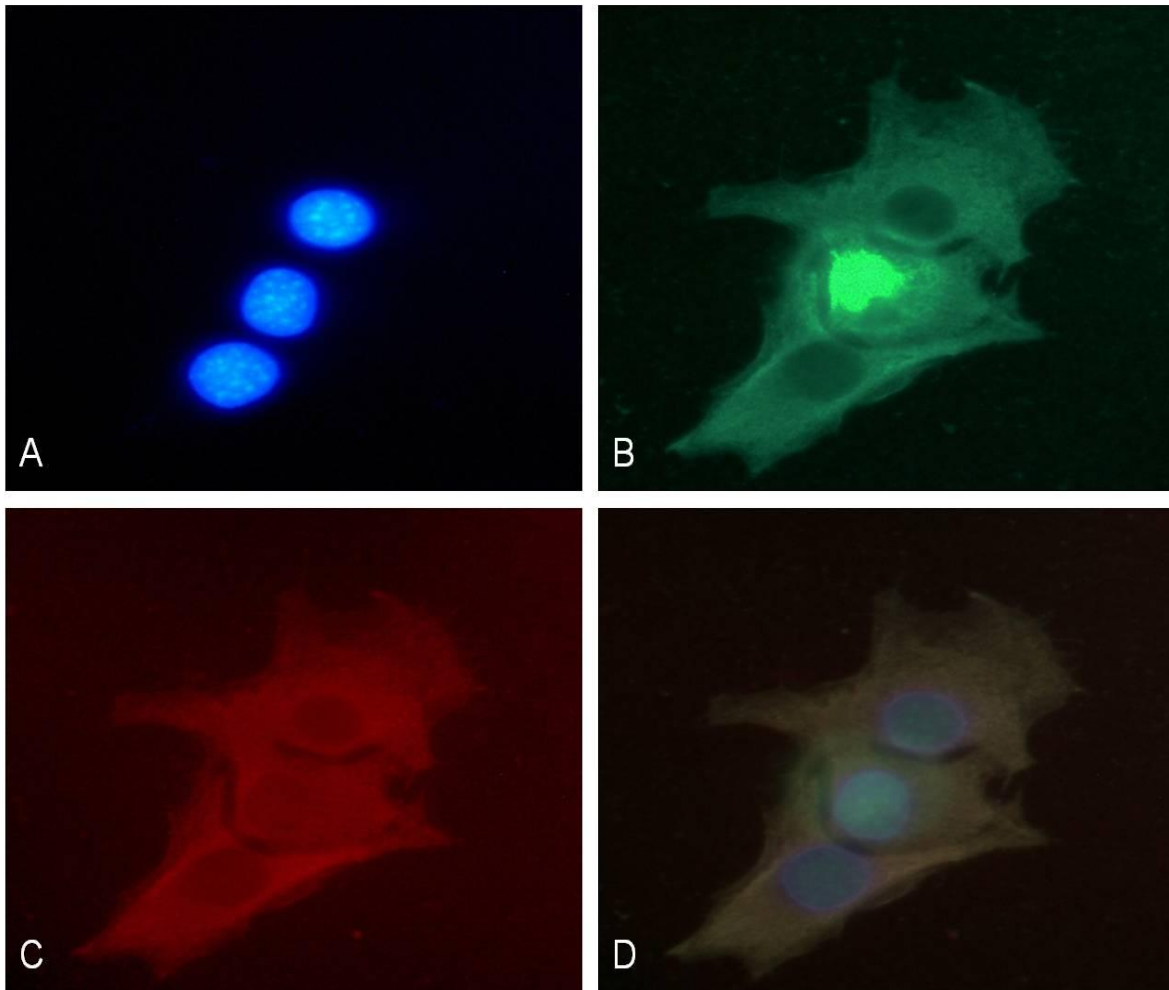


Figura 17. Controle negativo (ausência dos anticorpos primários) das reações mostradas nas duas figuras anteriores. Em A, núcleos corados com DAPI, em B e C as mesmas células observadas com filtros para FITC e Texas Red, respectivamente. Em D, observamos a sobreposição das imagens A e B. Aumento original 400X.

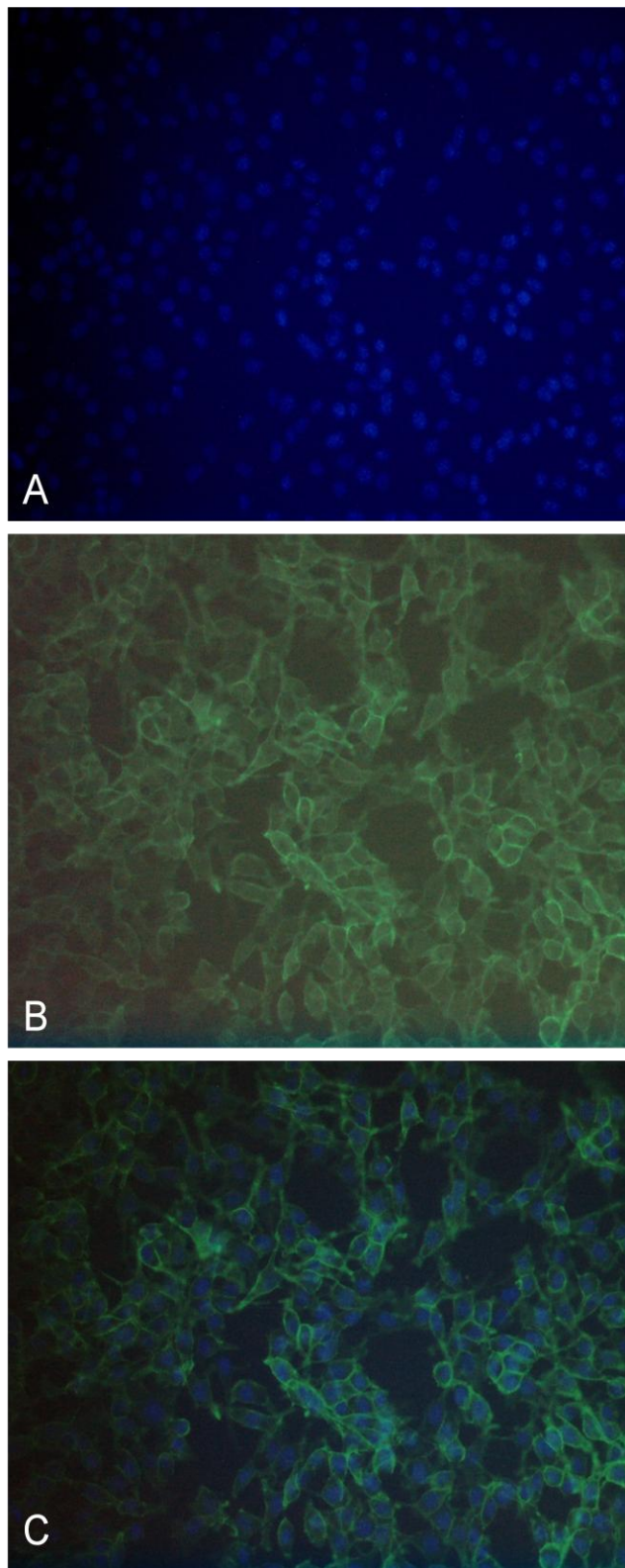


Figura 18. Imunofluorescência para detecção dos dímeros $\alpha 5\beta 1$ em células B16F10 plaqueadas sobre fibronectina. Podemos notar em A, a marcação do núcleo celular em azul (DAPI). Em B, a marcação (FITC) corresponde as integrinas $\alpha 5\beta 1$ nas membranas das células B16F10. A fotomicrografia C revela a sobreposição das imagens A e B. Aumentos originais 200X.

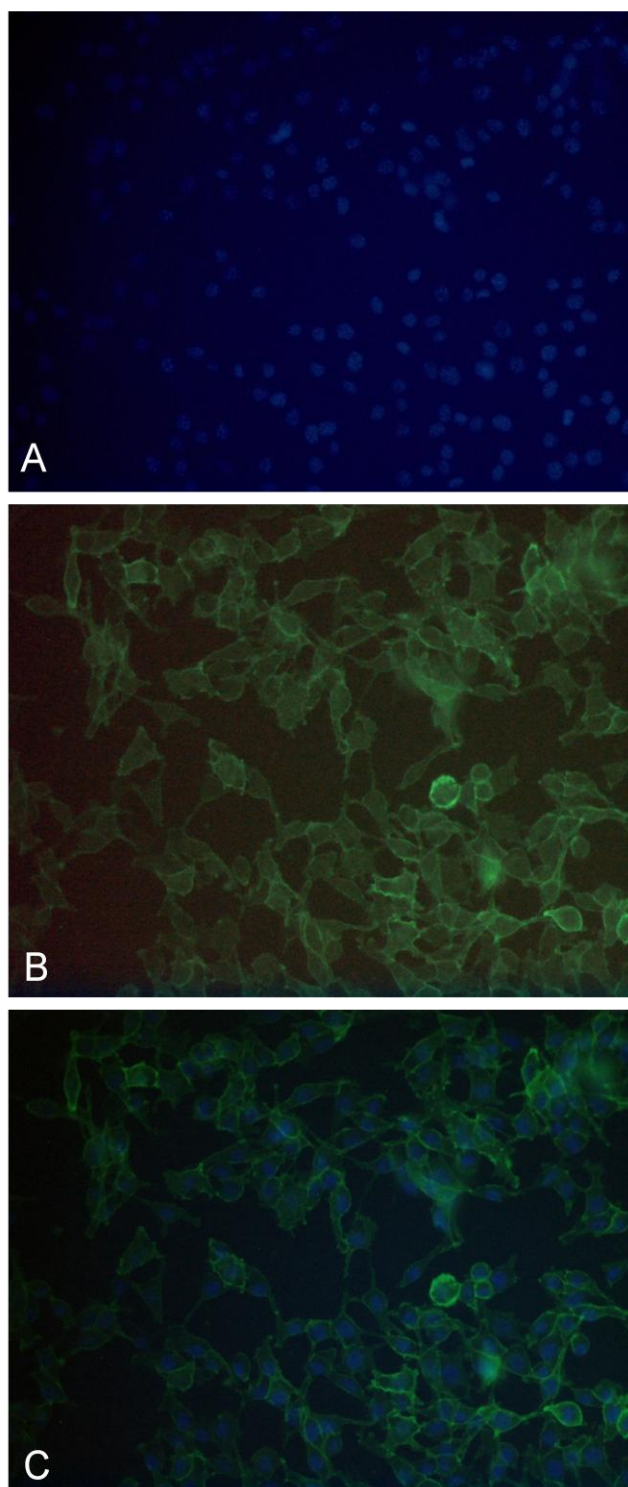


Figura 19. Imunofluorescência para a detecção das integrinas $\alpha 5 \beta 1$ em células B16F10 cultivadas sobre laminina. Podemos notar em A, a marcação do núcleo celular em azul (DAPI). Em B observa-se uma marcação verde intensa (FITC) que corresponde as integrinas $\alpha 5 \beta 1$ nas membranas das células B16F10. A Figura C corresponde a sobreposição das imagens A e B. Aumentos originais 200X.

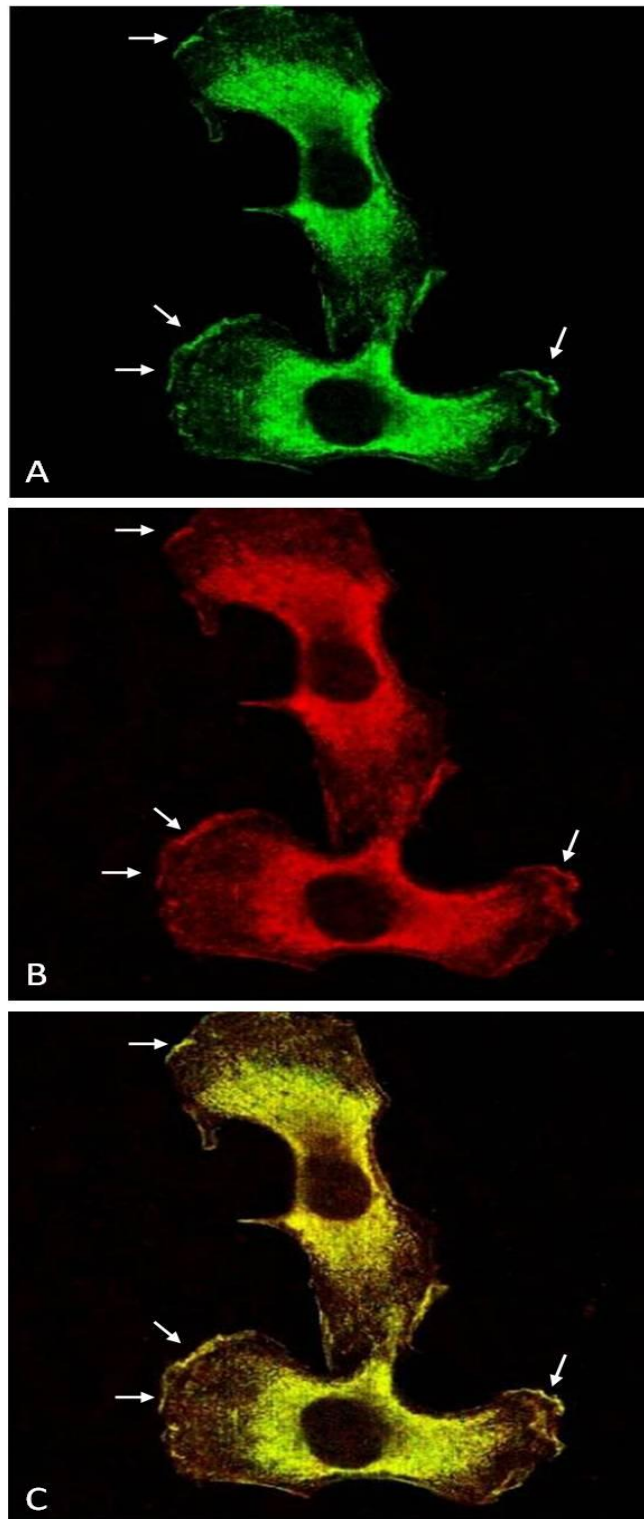


Figura 20. Imunofluorescência por dupla marcação para localização das integrinas $\alpha\beta 3$ na linhagem B16F10 aderida sobre laminina. Podemos observar em A regiões das células B16F10 (setas) marcadas com fluoresceína (FITC) correspondentes as subunidades αv e em B, as regiões positivas para as subunidades $\beta 3$, marcadas com anticorpo texas red. Notamos em C a sobreposição das imagens A e B, regiões correspondentes as integrinas $\alpha v\beta 3$ em células B16F10 (setas). Microscopia confocal, aumento original 40X

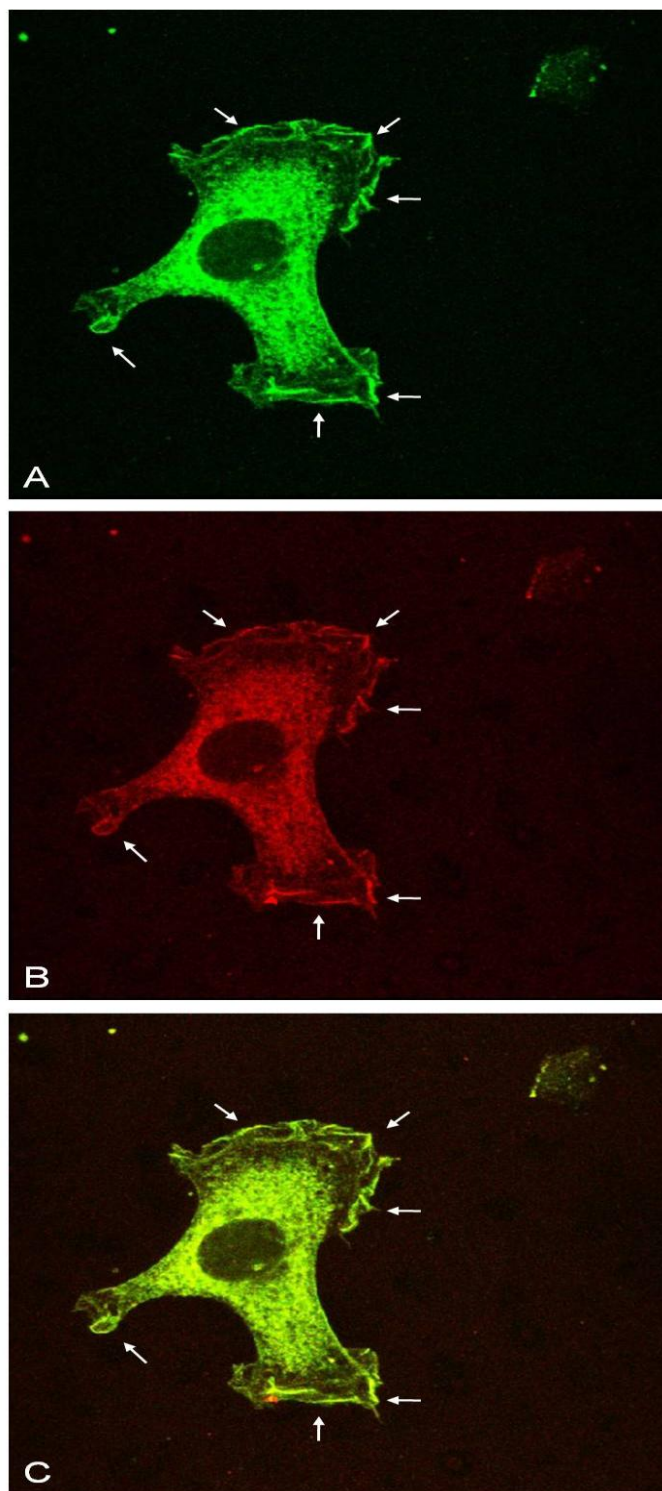


Figura 21. Imunofluorescência por dupla marcação para localização das integrinas $\alpha\beta3$ na linhagem B16F10 aderida sobre fibronectina. Podemos observar em A regiões das células B16F10 marcadas com fluoresceína (FITC) correspondentes as subunidade α e em B, as regiões positivas para a subunidade $\beta3$, marcadas com anticorpo texas red. Notamos em C a sobreposição das imagens A e B, regiões correspondentes as integrinas $\alpha\beta3$ em células B16F10 (setas). Microscopia confocal, aumento original 40X

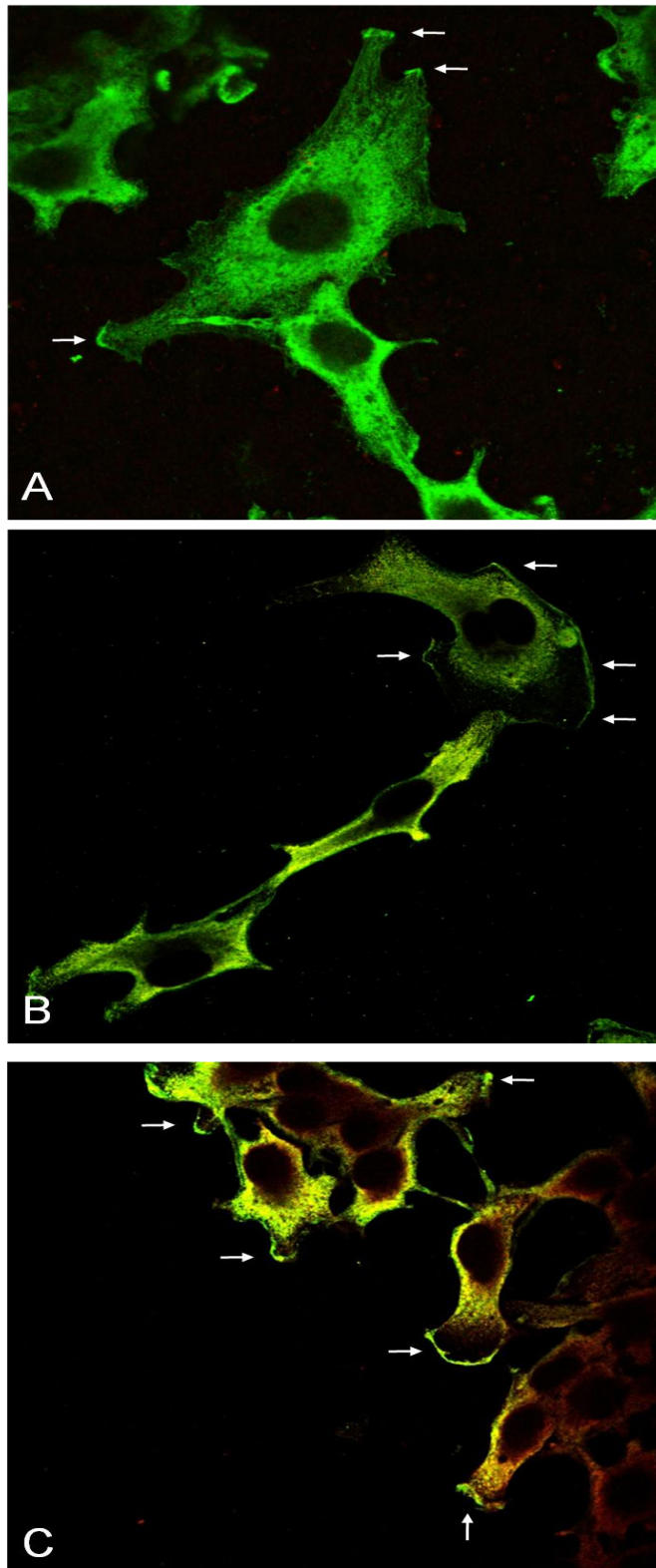


Figura 22. Imunofluorescência em células B16F10 plaqueadas sobre laminina. Em A, B e C podemos observar regiões de adesão focal (setas) das células B16F10, correspondentes as integrinas $\alpha\beta3$ tratadas com o diluente ETOH (controle positivo). Microscopia confocal. Aumento original 40X.

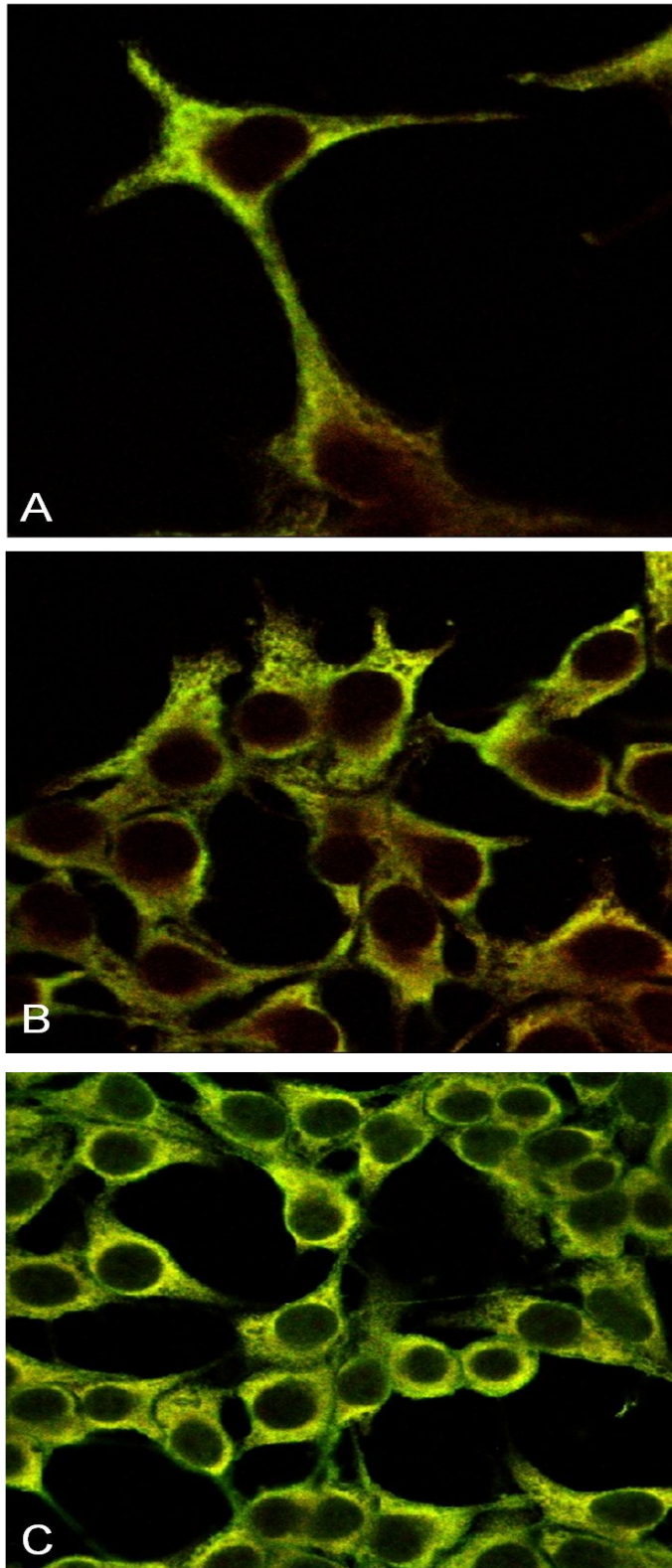


Figura 23. Imunofluorescência em células B16F10 plaqueadas sobre laminina. Em A, B e C notamos a ausência de marcação das regiões de adesão focal para as integrinas $\alpha\beta 3$ em células B16F10, tratadas com o diluente ETOH e sem adição dos anticorpos primários para $\alpha\beta 3$ (controle negativo). Microscopia confocal. Aumento original 40X.

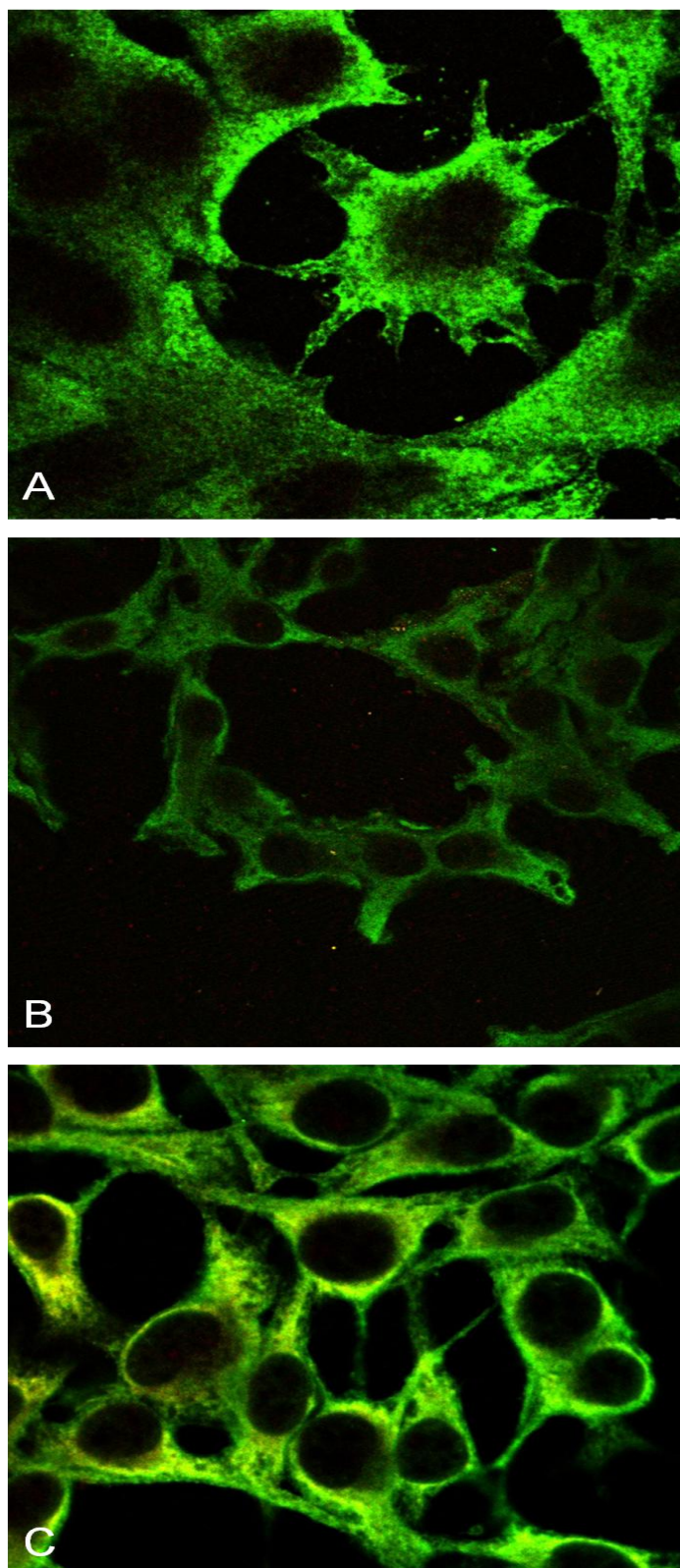


Figura 24. Imunofluorescência em células B16F10 plaqueadas sobre laminina. Podemos observar em A, B e C a ausência de marcação para as integrinas $\alpha 5 \beta 3$ nas regiões de adesão focal em células B16F10 tratadas com 250 μ M de orlistat. Microscopia confocal. Aumento original 40X.

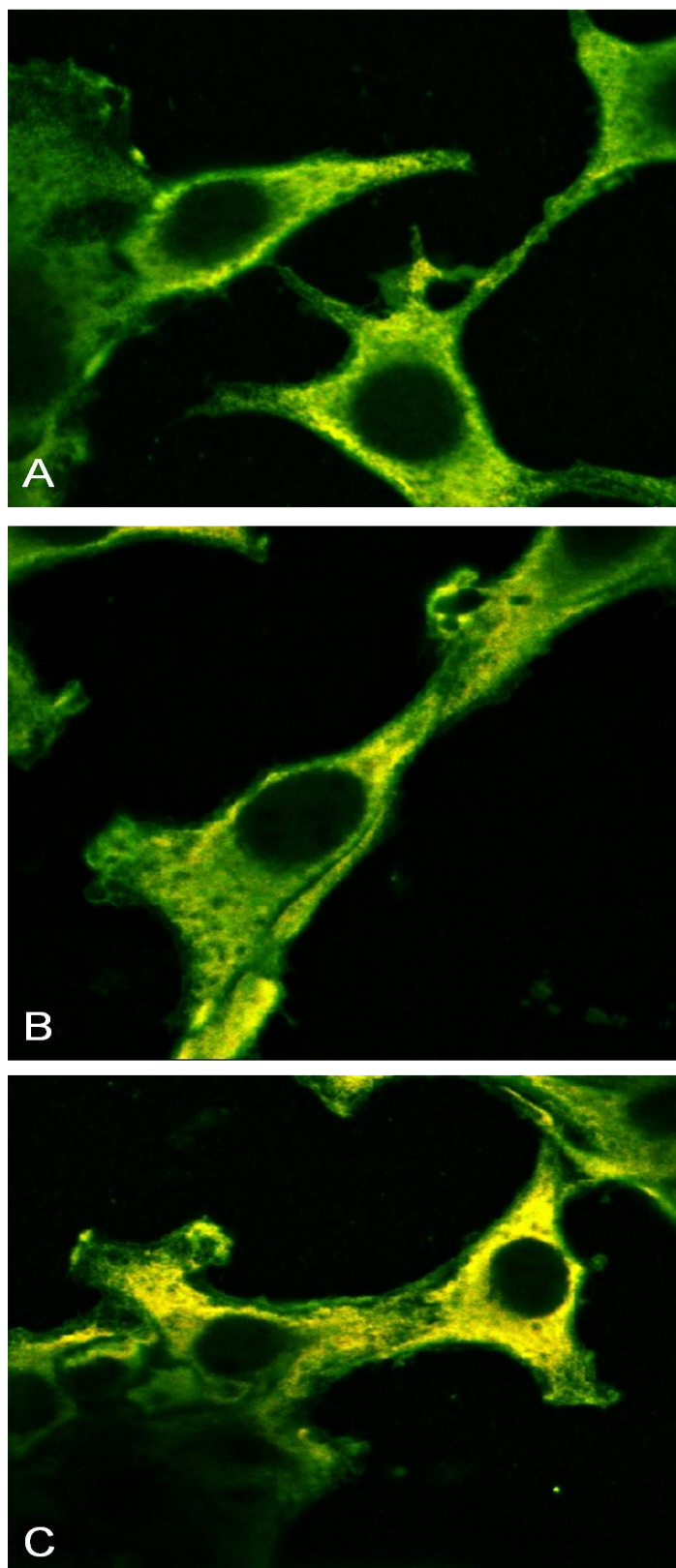


Figura 25. Imunofluorescência em células B16F10 plaqueadas sobre laminina. Podemos observar em A, B e C a ausência de marcação das regiões de adesão focal em células B16F10 tratadas com 250 μ M de orlistat e não inoculados com anticorpos primários anti- α v β 3 (controles negativos). Microscopia confocal. Aumento original 40X.

6. Discussão

Pesquisas relacionadas ao tratamento e melhoria do tempo e das condições de sobrevivência de pacientes com câncer têm sido uma das prioridades na área da saúde ao longo do último século. Temas relacionados aos mecanismos de inibição do ciclo celular, ao desenvolvimento de vacinas e construção de medicamentos com auxílio da nanotecnologia têm sido abordados por inúmeros centros de pesquisa ao redor do mundo. O estudo do papel da lipogênese em tumores malignos e sua inibição através do bloqueio da atividade de FASN tem se mostrado bastante promissor para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos durante a última década.

A hipótese de que a enzima FASN é um alvo relevante para o controle de tumores malignos está baseada principalmente na sua baixa expressão na grande maioria dos tecidos humanos adultos normais, ao contrário do que pode ser observado em diversos tipos de neoplasias malignas humanas (Milgraum *et al.* 1997, Alo *et al.* 2000, Swinnen *et al.* 2002, Pizer *et al.* 1998, Vlad *et al.* 1999, Piyathilake *et al.* 2000, Visca *et al.* 1999, Nemoto *et al.* 2001, Kusakabe *et al.* 2002, Innocenzi *et al.* 2003, Visca *et al.* 2003, Krontiras *et al.* 1999, Agostini *et al.* 2004, Silva *et al.* 2004, Takahiro *et al.* 2003; Rossi *et al.*, 2006; Orita *et al.* 2007; Orita *et al.* 2008; Li *et al.* 2008, Ogino *et al.* 2008; Silva *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010). Nestes tumores, FASN é altamente expressa gerando vantagens seletivas para as células malignas. Além do mais, vários estudos têm demonstrado uma associação positiva entre a expressão de FASN e um comportamento agressivo para algumas destas doenças (Epstein *et al.* 1995; Gansler *et al.* 1997, Alo *et al.*, 1999; Kuhajda 2000; Sebastiani *et al.*, 2004; Ogino *et al.*, 2008). Está claro também que inibidores específicos da atividade desta enzima são capazes de bloquear o ciclo celular e aumentar as taxas de apoptose em células derivadas de tumores de próstata, mama, estômago, intestino, endométrio, cavidade bucal e ovário (Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001; Agostini *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2005; Menendez *et al.*, 2006). Em tecidos derivados de carcinomas espinocelulares bucais, a cerulenina é capaz de reduzir a síntese de

ácidos graxos de forma mais eficiente do que nas amostras de mucosa oral normal (Guo *et al.*, 2003).

Em melanomas, existe uma correlação positiva entre expressão de FASN e índice de Breslow, além de uma correlação inversa entre a quantidade de FASN e o tempo de sobrevida total dos pacientes (Innocenzi *et al.* 2003). A alta expressão de FASN nestes tumores cutâneos de extrema agressividade parece estar associada a uma maior taxa de recorrência, maior risco de desenvolvimento de metástases e, conseqüentemente, pior prognóstico (Innocenzi *et al.* 2003). Apesar das fortes evidências sugerindo que a síntese endógena de ácidos graxos seja essencial para a proliferação de células malignas, não se conhece até o momento quais os mecanismos biológicos envolvidos. Em outras palavras, a maneira através qual a intensidade da síntese endógena de lipídios interfere no ciclo celular das células tumorais, podendo causar apoptose, é um ponto que merece ser bastante estudado nos próximos anos. Neste contexto, Swinnen *et al.* (2003) demonstraram que a atividade enzimática de FASN é necessária para a produção dos fosfolipídios que compõe regiões especializadas das membranas das células LNCaP (uma linhagem celular derivada de um adenocarcinoma de próstata metastático) ricas em colesterol e proteínas, conhecidas como *lipid rafts*. Estas regiões são importantes para diversas funções celulares como transdução de sinais, tráfego intracelular, polarização celular, migração e formação de protusões da membrana (Ikonen *et al.*, 1998; Manes *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 2000; Bagnat *et al.*, 2002). Portanto, a expressão e/ou atividade anormal de FASN pode causar profundos efeitos em várias vias de transdução de sinal e conseqüentemente estimular o crescimento celular (Swinnen *et al.*, 2003; Baron *et al.* 2004).

A observação mais importante desta tese reside no fato de que a inibição farmacológica da atividade de FASN reduz em cerca de 50% as metástases experimentais de melanoma em modelo murino. O mecanismo responsável por este fenômeno ainda não está elucidado e merece ser estudado com maiores detalhes, entretanto, nossos achados podem estar relacionados à redução de proliferação e/ou aumento da morte das células B16F10 por apoptose,

como demonstrado em trabalho anterior (Carvalho *et al.* 2008). Naquele trabalho, obtivemos uma redução semelhante na quantidade de metástases espontâneas para linfonodos torácicos, a partir de tumores intraperitoneais. Os resultados desta tese foram obtidos frente a um desafio maior, ou seja, células B16F10 inoculadas diretamente na circulação sanguínea, o que salienta a eficácia desta possível abordagem terapêutica.

Está bem claro na literatura que inibidores específicos da atividade de FASN bloqueiam a progressão do ciclo celular e inibem a proliferação de várias linhagens celulares derivadas de tumores malignos (Pizer *et al.* 1996, Pizer *et al.* 1998, Pizer *et al.* 2000, Li *et al.* 2001, Gabrielson *et al.* 2001, Zhou *et al.* 2003, Agostini *et al.* 2004, Kridel *et al.* 2004, Knowles *et al.* 2004, Menendez *et al.* 2005, Wang *et al.* 2005). A presença do orlistat nos tecidos e fluídos corporais, pode eventualmente reduzir a viabilidade das células tumorais circulantes, dificultando assim a formação das metástases, fato este suportado pelos achados relatados por nosso grupo em modelos animais. Outra possível explicação para nossos resultados anteriores de redução das metástases espontâneas pode residir no fato de que FASN seja capaz de interferir nos processos de angiogênese e/ou linfangiogênese, objetos de estudo de outras pesquisas do grupo (Fabiana Seguin, dissertação de mestrado 2009; Débora Bastos, dissertação de mestrado 2009). De fato, foi demonstrado por Browne *et al.* (2006) que a inibição de FASN com orlistat em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) causa redução na proliferação ao mesmo tempo que inibe a angiogênese através da inibição da exposição do receptor VEGFR2/KDR/Flk1 na superfície destas células endoteliais.

O modo pelo qual células metastáticas de melanoma invadem vasos linfáticos não é totalmente conhecido, porém, Padera *et al.* (2002) sugerem que o aumento dos níveis de VEGF-C em linhagens celulares de fibrossarcoma de camundongo (T-241) e de melanoma de camundongo (B16F10) possa favorecer a linfangiogênese, aumentando o diâmetro dos vasos linfáticos e consequentemente gerando maiores oportunidades para a sua invasão por células neoplásicas. Em nosso trabalho anterior (Carvalho *et al.* 2008), a inibição de FASN ocorreu de forma sistêmica, como foi demonstrado pela coloração para lipídios (Oil red-O)

realizada em amostras de fígado dos animais tratados ou não com orlistat, bem como da incorporação de água triciada nos tumores primários.

Os mecanismos envolvidos na inibição de metástases no modelo de melanoma murino utilizado neste trabalho devem ser estudados em profundidade, pois os resultados foram obtidos num tumor extremamente agressivo, obtido pela seleção de células altamente metastáticas (Fidler *et al.*, 1998). Observamos uma redução do tamanho e do número das metástases experimentais pulmonares nos animais estudados, embora o tamanho seja difícil de quantificar em lesões múltiplas e muitas vezes sobrepostas pela superfície pulmonar. Estudos utilizando outros modelos, como injeções subcutâneas de células B16F10 (Chan *et al.*, 1988; Pizer *et al.*, 2000; Taniguchi *et al.*, 2001; Vantyghem *et al.*, 2003), podem ser úteis para a elucidação do efeito do bloqueio de FASN no crescimento do tumor primário. Em recente trabalho realizado por Fabiana Seguin em sua dissertação de mestrado, foi demonstrado que a inibição da atividade de FASN causa significativa redução na extensão e ramificação dos vasos sanguíneos localizados na periferia de melanomas experimentais (Fabiana Seguin, dissertação de mestrado 2009). Até o momento, apesar de inúmeros estudos envolvendo processos de neoformação vascular, esta foi a primeira demonstração “*in vivo*” de que a inibição de FASN altera o fenômeno de angiogênese tumoral. Os mecanismos biológicos responsáveis pela redução na densidade dos vasos sanguíneos podem estar relacionados com os achados de Browne *et al.* (2006), que demonstraram que orlistat inibe a atividade de FASN em células endoteliais humanas (HUVEC) e promove redução da proliferação. Outro resultado interessante, obtido pelo nosso grupo na dissertação de mestrado de Débora C. Bastos, foi o aumento na extensão e ramificação dos vasos linfáticos ao redor de feridas experimentais ou melanomas provocados pelas células B16F10 em animais tratados com Orlistat (Débora Bastos, dissertação de mestrado 2009). Até o momento, a relação entre a inibição de FASN e a linfangiogênese não foi descrita na literatura. Os mecanismos biológicos responsáveis pelo aumento na densidade dos vasos linfáticos precisam ser melhor estudados, entretanto, podem estar relacionados a um mecanismo compensatório.

O surgimento das metástases é o principal responsável pelo prognóstico ruim dos pacientes com câncer e está intimamente associado à redução de tempo de sobrevida (Li *et al.* 2006). Dentre os tumores malignos, o melanoma ocupa um lugar de destaque pela sua capacidade de se espalhar rapidamente para diversos órgãos vitais como fígado, pulmões, cérebro, ossos e intestino delgado, dentre outros. Diversos autores têm relatado a participação de MMPs e integrinas no processo metastático dos melanomas. A participação das MMPs na evolução de neoplasias humanas (mama, cólon, pulmão, cabeça e pescoço, boca e melanoma) tem sido alvo de inúmeras pesquisas nas últimas décadas. De acordo com Väisänen (1999), o aumento da expressão de MMP-2 em melanomas está correlacionado com metástases hematogênicas. Além disso, tem sido demonstrado que existe uma correlação entre o aumento da expressão de MMP-1, -2 e -9 e um pior prognóstico para os pacientes portadores desta neoplasia, independentemente dos níveis de Clark e Breslow (Väisänen, 1999; Wollina *et al.* 2001; Nikkola *et al.* 2005). Segundo Pepper (2001), a expressão elevada de MMP-2 em melanomas está correlacionada ao aumento da quantidade da integrina $\alpha V\beta 3$ e também de MT1-MMP, que ativa MMP-2 e favorece a angiogênese. Zhang *et al.* (2006) observaram, em modelo animal de câncer oral, que os níveis protéicos e de mRNA de MMP-2 estão elevados durante o desenvolvimento do tumor, sendo mais altos nas metástases em linfonodos cervicais. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por nosso grupo, demonstrando uma correlação entre a atividade de MMP-2 e -9 e a redução no tempo de sobrevida livre de doença em pacientes com carcinoma oral (Yorioka *et al.* 2002).

Os resultados desta tese, no entanto, sugerem que não é através da modulação da atividade de MMP-2 e -9 que o Orlistat reduz a disseminação metastática dos tumores experimentais. Apesar dos zimogramas sugerirem uma redução na atividade destas duas MMPs, após a normalização dos experimentos realizada tanto pelo número de células presentes em cada condição experimental como pela concentração de DNA de cada *pellet* celular, não houve diferenças estatisticamente significantes dentro do período estudado (24 horas).

Possivelmente, o efeito citotóxico de doses elevadas de Orlistat sobre as células B16F10 em cultura contribuiu para estes resultados. Porém, está demonstrado na literatura, que MMP-2 participa da progressão tumoral e do processo de angiogênese em modelo animal de melanoma (Itoh *et al.* 1998). Segundo estes autores, os implantes subcutâneos de células B16-BL6 em camundongos C57BL/6J *knockout* para MMP-2 tiveram progressão reduzida e menor angiogênese. Sun *et al.* (2007) demonstraram que a hipóxia, induzida através de ligadura da artéria femoral de camundongos C57BL6, causa aumento da expressão de HIF-1 α e de VEGF em tumores provocados pela injeção intramuscular de células B16F10, com conseqüente aumento na angiogênese. No mesmo estudo, houve correlação positiva entre a expressão de MMP-2 e -9 e VEGF, sugerindo que o melanoma, em condições de hipóxia, estimula a angiogênese e que MMP-2 e -9 potencializam a invasão tumoral. Não se pode, entretanto, descartar um possível efeito *in vivo* da inibição de FASN sobre a atividade das MMPs no melanoma, apesar da aparente falta de efeito do orlistat em experimentos de cultura celular.

As integrinas α 1b β 3, α 2 β 1, α 4 β 1, α 5 β 1, e α v β 3 apresentam níveis elevados em melanomas humanos (Kuphal *et al.*, 2005), sendo a expressão de α 3, α 5, α 6, β 1, α 6 β 1, α v e β 3 associadas a um comportamento clínico mais agressivo (Hirken *et al.*, 1999; Anastassiou *et al.*, 2000; Elshaw *et al.*, 2001; Nikkola *et al.*, 2004; Pawelek & Chakraborty, 2008). Da mesma forma, as integrinas α 3 β 1 e α v β 3 estão correlacionadas a metástases linfáticas experimentais com linhagens derivadas de câncer de mama e melanoma de camundongo (Nip *et al.*, 1992; Tawil *et al.*, 1996; Liapis *et al.*, 1996), sendo β 1 também associada à metástases linfáticas em melanomas humanos (Hieken *et al.*, 1995). Recentemente foi relatado por Glinski (2009) e colaboradores, que a inibição de α v β 3 em linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 preveniu os efeitos angiogênicos de VEGF, reduzindo a proliferação *in vitro*. A integrina α 3 β 1 é responsável pela ativação das quinases de adesão focal (FAK) para reorganização do citoesqueleto, aumentando o potencial metastático em células humanas de hepatoma (Tang *et al.*, 2009). As FAK, por intermédio de β 3, também

exercem um papel fundamental na promoção das metástases de tumores mamários (Wendt & Schiemann, 2009). Em nosso trabalho, o tratamento de células derivadas de melanoma de camundongo B16F10 com 250 μ M de orlistat reduziu significativamente as regiões de adesão focal positivas para as integrinas $\alpha\beta 3$, fato que sugere que uma provável redução no poder adesivo desta linhagem com redução do número de ilhas metastáticas pulmonares no modelo *in vivo*. Nieswandt (1999) e colaboradores demonstraram em camundongos que a adesão de células malignas as plaquetas da corrente sanguínea são mediadas pelas integrinas $\alpha\beta 3$ e que esta parceria leva as células tumorais a sobrevivência por não serem atacadas pelas células *natural Killer* facilitando o espalhamento do tumor aos tecidos adjacentes. Existem inúmeras proteínas envolvidas na transdução de sinais, apoptose, transporte de membrana e adesão celular que estão associadas aos “Lipid Rafts” (Verkade et al., 1997; Pike LJ, 2003; Bollinger et al., 2005), como por exemplo a proteína oncogênica ErbB2 (Menendez et al., 2005). Esta última, por sua vez, pode se associar a integrina $\alpha 6\beta 4$ (Guo et al., 2006). Alta expressão de FASN pode afetar a estrutura e função das membranas lipídicas (Rakheja et al., 2005) favorecer a progressão e a sobrevivência de células malignas (revisado por Liu et al., 2010).

Inúmeras pesquisas têm associado as integrinas com proliferação celular em tumores malignos, assim como com os processos de invasão e sobrevivência destas células. A participação das integrinas na invasão e migração celular de tumores malignos tem sido objeto constante de estudos na área de biologia tumoral e alvo de revisões frequentes (Guo et al., 2004; Mitra et al., 2006). Nos últimos anos, houve progresso utilizando-se antagonistas de integrinas na pesquisa de tratamentos contra o câncer. Estudos pré-clínicos e mesmo clínicos têm demonstrado eficácia no bloqueio da progressão de tumores malignos. Experimentos em fase clínica II utilizando-se a droga Cilengitide (desenvolvida pela Merck) associada a antagonistas das integrinas $\alpha\beta 3$ e $\alpha\beta 5$ têm apresentado bons resultados clínicos e poucos efeitos colaterais em pacientes com glioblastoma, o que levou aos primeiros testes clínicos de fase III. Recentemente Ria (2010) e colaboradores apresentaram uma revisão de novas

drogas antagonistas da integrina $\alpha\beta3$ que estão sendo testadas em fases clínicas como o Vitaxin (MEDI-52) e o EMD 121974, que atuam como agentes anti-angiogênicos (Barkan et al., 2008; Reynolds et al., 2009). Outras pesquisas em fase clínica de teste incluem também inibidores de MMPs e MEC (Batimastat, Marimastat, Endostatina), inibidores angiogênicos (Talidomida e Lenalidomida) e inibidores de receptores de VEGF (Bevacizumab, PTK/ZK, DC101). Nos ensaios de adesão apresentados nesta tese, a interação entre componentes da matriz extracelular reconhecidamente ligantes das integrinas $\alpha\beta3$ e $\alpha5\beta1$, foi aumentada nas células tratadas com orlistat, em comparação aos controles. Aumento semelhante na adesão ocorreu quando a cerulenina foi utilizada para inibir FASN. Isto provavelmente não ocorre através de $\alpha\beta3$, como sugerem os ensaios de imunofluorescência, que mostram redução desta integrina após tratamento com orlistat.

Diversos autores sugerem que a expressão de algumas integrinas pode estar associado a fatores clínico-patológicos, como tempo de sobrevida e agressividade em melanomas. Por exemplo, Nikkola et al. (2003) demonstraram uma correlação entre a expressão das integrinas $\beta1$ e αv com o tempo de sobrevida livre de doença de 55 pacientes portadores de metástases de melanoma. Aqueles que apresentavam menor positividade para a integrina $\beta1$ tiveram sobrevida livre de doença de 17 meses, ao contrário dos pacientes que apresentaram mais positividade para $\beta1$, que tiveram sobrevida livre de doença reduzida para 5,7 meses. Do mesmo modo, pacientes com baixa ou média positividade para a integrina αv tiveram uma sobrevida livre de doença 8 vezes maior do que nos pacientes na qual a positividade foi forte. Hieken et al. (1996) encontraram uma correlação positiva entre a expressão da integrina $\beta3$ e uma menor sobrevida para o paciente, assim como o reaparecimento da doença mais rapidamente do que o observado nos casos negativos para a integrina $\beta3$.

Em resumo, os resultados aqui apresentados mostram que a injeção intraperitoneal de Orlistat em camundongos C57BL6 reduz o número de colônias metastáticas pulmonares. Foi observado também que o tratamento de células B16F10 com Orlistat ou cerulenina acarretou em aumento da adesão destas células à laminina, o que não foi observado com a fibronectina. Além do mais, o

tratamento com Orlistat em células B16F10 foi capaz de inibir a formação das placas de adesão focal associadas a integrina $\alpha v\beta 3$. Em conjunto, estes resultados confirmam que inibidores de FASN podem ter potencial terapêutico para o tratamento de melanomas e outros tipos de malignidade.

7. Conclusões

1. Camundongos C57BL6 que receberam injeções intravenosas de células B16F10 e foram tratados com doses diárias de Orlistat pelo período de 21 dias apresentaram 53,6% de diminuição no número de colônias metastáticas experimentais, em comparação aos grupos controle.
2. O tratamento de células B16F10 com 250 μ M de orlistat ou 5 μ g/ml de cerulenina aumenta a adesão à proteína de matriz extracelular laminina.
3. O tratamento de células B16F10 com 5 μ g/ml de cerulenina aumentou significativamente a adesão à fibronectina.
4. A atividade enzimática de MMP-2 e -9 não é alterada nas células B16F10 tratadas com o inibidor de FASN orlistat.
5. O tratamento das células B16F10 cultivadas sobre laminina com 250 μ M de Orlistat promove diminuição das regiões de adesão focal positivas para a integrina α v β 3.

Referências*

- Albeda SM, *et al.* Integrin distribution in malignant melanoma: association of the $\beta 3$ subunit with tumor progression. *Cancer Research* 1990; 50: 6757-6764.
- Agostini M, Silva S, Zecchin KG, Coletta RD, Jorge J, Loda M *et al.* Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol* 2004; 40 (7): 728-735.
- Alghisi GC, Ruëgg C. Vascular Integrins in tumor angiogenesis: Mediators and therapeutic targets. *Endothelium* 2006; 13: 113-135.
- Alli PM, Pinn ML, Jaffee EM, Mcfadden JM e Kuhajda FP. Fatty acid synthase inhibitors are chemopreventive for mammary cancer in *neu-N* transgenic mice. *Oncogene* 2005; 24: 39-46.
- Almeida JP, Coletta RD, Silva SD, Agostini M, Vargas PA, Bozzo L *et al.* The proliferation of fibroblasts cultured from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis is dependent on fatty acid synthase activity. *J Periodontol* 2005; 76(2): 272-278.
- Anastassiou G, Schilling H, Djakovic S, Bornfeld N. Expression of VLA-2, VLA-3, and alpha(v) integrin receptors in uveal melanoma: association with microvascular architecture of the tumour and prognostic value. *Br J Ophthalmol.* 2000 Aug;84(8):899-902.
- Alo' PL, Visca P, Marci A, Mangoni A, Botti C, Di Tondo U. Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer* 1996; 77 (3): 474-482.
- Assolan R.K. & Klein E.A. Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness. *Trends Cell Biology.* 2008 18, 347-352.
- Anastassiou G, Schilling H, Djacovic S e Bornfeld N. Expression of VLA-2, VLA-3, and alpha(v) integrin receptors in uveal melanoma: association with microvascular architecture of the tumour and prognostic value. *Br J Ophthalmol* 2000; 84 (8): 899-902.

*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

-Atallah E, Flaherty L. Treatment of metastatic malignant melanoma. *Curr Treat Options Oncol* 2005; 6 (3):185-93.

-Baron A, Migita T, Tang D, Loda M. Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *J Cell Biochem* 2004; 91 (1):47-53.

-Bastian BC, LeBoit PE, Hamm H, Bröcker EB, Pinkel D. Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Indian J Dent Res.* 1997 Oct-Dec;8(4):119-22. Review.

-Bagnat M, Simons K. Cell surface polarization during yeast mating. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 29;99(22):14183-8. Epub 2002 Oct 8.

-Belágyi T, Zsoldos P, Makay R, Issekutz A, Oláh A. Multiorgan resection (including pancreas) for metastasis of cutaneous malignant melanoma. *Journal of the Pancreas* 2006; 7 (2): 234-240.

-Brink J, Ludtke ST, Yang Chao-Yuh, Gu Zei-Wei, Wakil SJ, Chiu W. Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2001; 99 (1): 138-143.

-Brusselmans K, De Schrijver E, Verhoeven G, Swinnen JV. RNA interference-mediated silencing of the acetyl-CoA-carboxylase- α gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2005 Aug 1;65(15):6719-25.

-Carvalho MA, Zecchin KG, Seguin F, Bastos DC, Agostini M *et al.* Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model. *Int J Cancer* 2008; 123: 2557-2565.

-Cauwe B, Van den Steen PE, Opdenakker G. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2007; 42 (3): 113-185.

-Chalbos D, Chambon M, Ailhaud G, Rochefort H. Fatty acid synthetase and its mRNA are induced by progestins in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 1987 Jul 25;262(21):9923-6.

-Chambon M, Rochefort H, Vial HJ, Chalbos D. Progestins and androgens stimulate lipid accumulation in T47D breast cancer cells via their own receptors. J Steroid Biochem. 1989 Nov;33(5):915-22.

-Chan WS, Page CM, Maclellan JR, Turner GA. The growth and metastasis of four commonly used tumor lines implanted into eight different sites: evidence of site and tumor effects. Clin Expl Metastasis 1988; 3: 233-244.

-Chajès V, Cambot M, Moreau K, Lenoir GM, Joulin V. Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. Cancer Res. 2006 May 15;66(10):5287-94.

-Chin L, Merlino G, DePinho RA. Malignant melanoma: modern black plague and genetic black box. Genes and Development 1998; (12): 3467-3481.

-Chin L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. Nat Rev Cancer 2003; 3 (8): 559-570.

-Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. Genes Dev 2006; 15;20(16):2149-82.

-Chirala SS, Jayakumar A, Gu Z-W, Wakil SJ. Human fatty acid synthase: role of interdomain in the formation of catalytically active synthase dimer. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98 (6): 3104-3108.

-Chirala SS, Chang H, Matzuk M, Abu-Elheiga L, Mao J, Mahon K *et al.* Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. Proc. Natl. Acad. Sci USA 2003; 100 (11): 6358-6363.

-Chudnovsky Y, Adams AE, Robbins PB, Lin Q, Khavari PA. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. J Clin Invest 2005; 155(4):813-24.

-Clegg DJ, Wortman MD, Benoit SC, Mcosker CC, Seeley RJ. Comparison of central and peripheral administration of C75 on food intake, body weight, and conditioned taste aversion. Diabetes 2002; .51: 3196-3201.

-Dédora Campanella Bastos. Efeitos da inibição da atividade de FASN sobre a linfangiogênese em modelo murino. 2009. 124p. Dissertação (Mestrado em estomatopatologia) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2009.

-Gray-Schopfer VC, da Rocha Dias S e Marais R. The role of B-RAF in melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 2005 24, 165–183.

-Dedhar S, Hannigan GE. Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 657-669.

-De Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W *et al.* RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Research* 2003; 63 (13): 3799-3804.

-Dietrich T, Onderka J, Bock F, Kruse FE, Vossmeier D, Stragies R, Zahn G, Cursiefen C. Inhibition of inflammatory lymphangiogenesis by integrin $\alpha 5$ blockade. *Vascular Biology, Atherosclerosis and Endothelium Biology* 2007; 171 (1): 361-372.

-Erckon CA. From the crest to the periphery: Control of pigmented cell migration and lineage segregation. *Pigment Cell Res* 1993; 6: 336-347.

-Elshaw SR, Sisley K, Cross N, Murray AK, MacNeil SM, Wagner M, Nichols CE, Rennie IG. A comparison of ocular melanocyte and uveal melanoma cell invasion and the implication of $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 6\beta 1$ integrins. *Br Journal of Ophthalmology* 2001; 85: 732-738.

-Elwood JM, Jopson J. Melanoma and Sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer* 1997. 9;73(2):198-203.

-Epstein JI, Carmichael M, Partin AW. OA-519 (fatty acid synthase) as an independent predictor of pathologic state in adenocarcinoma of the prostate. *Urology* 1995; 45 (1): 81-86.

-Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer* 2002;2: 161-173.

-Fabiana Seguin. Estudo do papel biológico da enzima ácido graxo sintase (FASN) na angiogênese induzida por melanoma murino. 2009. 111p. Dissertação (Mestrado em estomatopatologia) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2009.

-Feldman ED, Pingpank JF, Alexander Jr. R. Regional treatment options for patients with ocular melanoma metastatic to the liver. *Annals of Surgical Oncology* 2004; 11 (3): 290-297.

-Feldman-Habermann B. *et al.* Integrin activations controls metastasis in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98, 1853-1858.

-Fidler IJ. Biology of melanoma metatasis. Em: Bach CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong S (eds) *Cutaneous melanoma*. Quality Medical Publishing 1998, pp 493-516.

-Filardo EJ, Brooks PC, Deming SL, Damsky C, Cheresch DA. Requirement of the NPXY motif in the integrin beta 3 subunit cytoplasmic tail for melanoma cell migration in vitro and in vivo. *J Cell Biol.* 1995 Jul;130(2):441-50.

-Furuya Y, Akimoto S, Yasuda K, Ito H. Apoptosis of androgen-independent prostate cell line induced by inhibition of fatty acid synthesis. *Anticancer Res* 1997; 17 (6D):4589-4593.

-Gabrielson EW, Pinn ML, Testa JR, Kuhajda FP. Increased fatty acid synthase is a therapeutic target in mesothelioma. Clin Cancer Res 2001; 7 (1): 153-157.

-Gansler TS, Hardman W 3rd, Hunt DA, Schaffel S, Hennigar RA. Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival. Hum Pathol 1997; 28 (6): 686-692.

-Garraway LA, Weir BA, Zhao X, Widlund H, Beroukhi R, Berger A, Rimm D, Rubin MA, Fisher DE, Meyerson ML, Sellers WR. "Lineage addiction" in human cancer: lessons from integrated genomics. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2005;70:25-34.

-Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. Science 1999; 285: 1028-1032.

-Ghosh P, Chin L. Genetics and Genomics of melanoma. Expert Rev Dermatol. 2009 1;4(2):131-143.

-Guercioli R. Mode of action of Orlistat. Int J Obes Relat Metab Disord 1997; 21 (Suppl 3): S12-S23.

-Guo W & Giancotti FG. Integrin signalling during tumor progression. Nature Rev. Mol. Cell. Biol. 2004; 5:816-826.

-Guo W, Pylayeva Y, Pepe A, Yoshioka T, Muller WJ, Inghirami G, Giancotti FG. $\beta 4$ integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis. Cell 2006; 126: 489-502.

-Habermann BF, Fransvea E, O'Toole TE, Manzuk L, Faha B e Hensler M. Involvement of tumor cell integrin $\alpha V\beta 3$ in hematogenous metastasis of human melanoma cells. Clinical & Experimental Metastasis 2002; 19: 427-436.

- Hall HI, Miller DR, Rogers JD, Bewerse B. Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40: 35-42.
- Hawes D, Neville AM, Cote RJ. Occult metastasis. *Biomed Pharmacother* 2001; 55(4): 229-242.
- Hata T, Sano Y, Matsumae A, Kamio Y, Nomura S, Sugawara R. Study of new antifungal antibiotic. *Jpn J Bacteriol* 1960a; 15: 1075-1077.
- Hata T, Matsumae A, Nomura S, Kim T, Ryan K. Studies on cerulenin, a new antifungal antibiotic. II. Biological characteristic and therapeutic effect of cerulenin. *Jpn J Med Mycol* 1960b; 1: 382-383.
- Hayward, N.K. Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene* 2003; 22, 3053–3062.
- Hicks MJ, Flaitz CM. Oral mucosal melanoma: epidemiology and pathobiology. *Oral Oncology* 2000; 36: 152-169.
- Hieken TJ, Ronan SG, Farolan M, Shilkaitis AL, Kin DK, Das Gupta TK. Beta 1 integrin expression in malignant melanoma predicts occult lymph node metastases. *Surgery* 1995; 118: 669-675.
- Hieken TJ, Ronan SG, Farolan M, Shilkaitis AL, Gupta TK. Molecular prognostic markers in intermediate thickness cutaneous malignant melanoma. *Cancer* 1999; 2 (85): 375-382.
- Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GNP and Ruiter DJ. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *Journal of Investigation Dermatology* 2000; 115: 337-336.
- Hofmann UB, Houben R, Bröcker EB and Becker JC. Role of matrix metalloproteinase in melanoma cell invasion. *Biochimie* 2005; 87: 307-314.
- Innocenzi D, Alo PL, Balzani A, Sebastián V, Silipo V, La Torre G *et al.* Fatty acid synthase expression in melanoma. *J Cutan Pathol* 2003; 30 (1): 23-28.
- Ikonen E, Simons K. Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to the plasma membrane in polarized cells. *Semin Cell Dev Biol.* 1998 Oct;9(5):503-9. Review.

-Itoh T, Tanioka M, Yoshida H *et al.* Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Research* 1998; 58: 1048-1051.

-Jayakumar A, Tai M, Huang W, Al-Fell W, HSU M, Abu-Elheiga L, Chirala SS, Wakil, SJ. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92 (19): 8695-8699.

-Jimbow K, Quevedo Jr WC, Fitzpatrick T, Szabo G. *In Dermatology in General Medicine* (eds. Fitzpatrick, T. B. *et al.*) 261–289 (McGraw-Hill, Inc, New York, 1993).

-Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F *et al.* Functional and Physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2 1998;7;95(14):8292-7.

-Kapur P, Rakheja D, Roy LC, Iloang MP. Fatty acid synthase expression in cutaneous melanocytic neoplasms. *Modern Pathol* 2005; 18: 1107-1112.

-Katz KA, Jonasch E, Hodi FS, Soiffer R, Kwitkiwski K, Sober AJ, Haluska FJ. Melanoma of unknown primary: experience at Massachusetts General Hospital and Dana-Farber Cancer Institute. *Melanoma Research* 2005; 15 (1): 77-82.

-Knowles LM, Axelrod F, Browne CD, Smith JW. A fatty acid synthase blockade induces tumor cell-cycle arrest by down-regulating Skp2. *J Biol Chem* 2004; 279 (29): 30540-30545.

-Ko HM, Kang JH, Jung B, Kim HA, Park SJ, Kim KJ *et al.* Critical role for matrix metalloproteinase-9 in platelet-activating factor-induce experimental tumor metastasis. *International Journal of Cancer* 2007; 120: 1277-1283.

-Koprowski H, Herlyn M, Balaban G, Parmiter A, Ross A, Nowell P. Expression of the receptor for epidermal growth factor correlates with increased dosage of chromosome 7 in malignant melanoma 1985; *Somat Cell Mol Genet.* 1985 May;11(3):297-302.

-Kridel SJ, Axelrod F, Rosenkrants N, Smith W. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Research* 2004; 64: 2070-2075.

-Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, Myers RB, Mayo MS, Peters GE et al. Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. *Head Neck* 1999; 21 (4): 325-329.

-Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL, Townsend CA. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *PNAS* 2000; 97 (7): 3450-3454.

-Kuhajda FP. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition* 2000; 16 (3): 202-208.

-Kumar MV, Shimokawa T, Nagy TR, Lane MD. Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice. *PNAS* 2001; 99 (4): 1921-1925.

-Kumar-Sinha C, Ignatoski KW, Lippman ME, Eisher SP, Chinnaiyan AM. Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. *Cancer Research* 2003; 63 (1): 132-139.

-Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff AK. Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 2005; 24: 195-222.

-Kusakabe T, Nashimoto A, Honma K, Suzuki T. Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. *Histopathology* 2002; 40 (1): 71-79.

-Lee ML, Tomsu K, Von Eschen KB. Duration of survival for disseminated malignant melanoma: results of meta-analysis. *Melanoma Res* 2000; 10: 81-92.

-Lee JS, Lee MS, Oh WK, Sul JY. Fatty acid synthase inhibition by amentoflavone induces apoptosis and antiproliferation in human breast cancer cells. *Biol Pharm Bull.* 2009 Aug;32(8):1427-32.

-Lemaitre V, D'Armiento J. Matrix metalloproteinase in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2006; 78 (1): 1-10.

-Li JN, Gorospe M, Cherst FJ, Kumaravel TS, Evans MK, Han WH et al. Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic

and citotoxic effects modulated by p53. *Cancer Research* 2001; 61 (4): 1493-1499.

-Li X, Chen B, Blystone SD, McHugh KP, Ross FP, Ramos DM. Differential expression of alpha v integrins in K1735 melanoma cells. *Invasion Metastasis* 1998; 18: 1-14.

-Li W, Sanki A, Karim RZ, Thompson JF, Lee CS *et al.* The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Royal College of Pathologists of Australia (Pathology)* 2006; 38(4): 287-301.

-Liu B, Wang Y, Fillgrove KL, Anderson VE. Triclosan inhibits enoyl-reductase of type I fatty acid synthase in vitro and is cytotoxic to MCF-7 and SKBr-3 breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002 Mar;49(3):187-93. Epub 2002 Jan 9.

-Liu H, Liu JY, Zhang JT. Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase and emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker. *Int J Biochem Mol Biol* 2010; 18: 1(1):69-89

-Liang KV, Sanderson SO, Nowakowski GS, Arora AS. Metastatic malignant melanoma of the gastrointestinal tract. *Mayo Clin Proc* 2006; 81 (4): 511-516.

-Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64: 327-336.

-Little JL, Wheeler FB, Fels DR, Koumenis C, Kridel SJ. Inhibition of fatty acid synthase induces endoplasmic reticulum stress in tumor cells. *Cancer Res* 2007 67: 1262–1269.

-Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD *et al.* Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 2000; 288 (5475): 2379-238.

-Lu S, Archer MC. Fatty acid synthase is a potential molecular target for the chemoprevention of breast cancer. *Carcinogenesis.* 2005 Jan;26(1):153-7. Epub 2004 Sep 9.

-Mason MD, Allmn R and Quibell M. Adhesion molecules in melanoma-more than just superglue? Journal of the Royal Society of Medicine 1996; 89: 393-395.

-Mackie BS, Mackie LE. Etiology and Prevention of melanoma. Nutr Cancer 2001; 40(2):211-13.

-Medes G, Thomas A, Weinhouse S. Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. Cancer Res. 1953 Jan;13(1):27-9.

-McNeel DG, Eickhoff J, Lee FT, King DM, Alberti D *et al.* Phase I trial of a monoclonal antibody specific for $\alpha V\beta 3$ integrin (medi-522) in patients with advanced malignancies, including an assessment of effect on tumor perfusion. Clinical Cancer Research 2005; 11: 7851-7860.

-McWilliams RR, Rao RD, Brown PD, Link MJ, Buckner JC. Treatment options for brain metastases from melanoma. Expert Rev Anticancer Ther 2005; 5 (5): 809-820.

-Menendez JA, Vellon L, Mehmi I, Oza BP, Ropero S, Colomer R, et al. Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101(29):10715-20.

-Menendez JA, Colomer R, Lupu R. Why does tumor-associated fatty acid synthase (oncogenic antigen-519) ignore dietary fatty acids? Medical Hypotheses 2005a; 64: 342-349.

-Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. Curr Opin Cell Biol. 2006 Oct;18(5):516-23. Epub 2006 Aug 17.

-Milgraum LZ, Witters LA, Pasternack GR, Kuhajda FP. Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in situ breast carcinoma. Clin Cancer Res 1997; (11): 2115-2120.

-Montgomery AMP, Reisfeld RA, Cheresch DA. Integrin $\alpha V\beta 3$ rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. Proc. Natl. Acad. Sci USA 1994; 91: 8856-8860.

-Nemoto T, Terashima S, Kogure M, Hoshino Y, Kusakabe T, Suzul T et al.. Overexpression of fatty acid synthase in oesophageal squamous cell dysplasia and carcinoma. *Pathobiology* 2001; 69 (6): 297-303.

-Nikkola J, Vihinen P, Vlaykova T, Hahka-Kemppinen M, Heino J, Pyrhonen S. Integrin chains beta 1 e alphav as a prognostic factors in human metastatic melanoma. *Melanoma Research* 2004; 14 (1): 29-37.

-Nikkola J, Vihinen P, Vuoristo MS, Lehtinen PK, Kähäri VM, Pyrhönen S. High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma. *Clinical Cancer Research* 2005; 11 (14): 5158-5166.

-Nip J, Shibata H, Loskutoff DJ, Cheresch DA, Brodt P. Human melanoma cells derived from lymphatic metastases use integrin $\alpha V\beta 3$ to adhere to lymph node vitronectin. *J. Clin. Invest* 1992; 90: 1406-1413.

-Nordlund JJ. The lives of pigmented cells. *Dermatol Clin.* 1986; 4(3): 407-418. Review

-Ômura S. The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis. *Am Soc Microbiol* 1976; 3 (40): 681-697.

-Ookhtens M, Kannan R, Lyon I, Baker N. Liver and adipose tissue contributions to newly formed fatty acids in an ascites tumor. *Am J Physiol.* 1984 Jul;247(1 Pt 2):R146-53.

-Ouyang L, Shen LY, Li T, Liu J. Inhibition effect of Oncostatin M on metastatic human lung cancer cells 95-D *in vitro* and murine melanoma cells B16BL6 *in vivo*. *Biomedical Research* 2006; 27 (4): 197-202.

-Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, Choi NC, Mathisen D, Wain J, Mark EJ, Munn LL, Jain RK. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science.* 2002 Jun 7;296(5574):1883-6. Epub 2002 Apr 25

-Pasco S, Ramont L, Maquart FX and Monboisse. Control of melanoma progression by various matrikines from basement membrane macromolecules. *Critical Reviews in*

Oncology/ Hematology 2004; 49: 221-233.

-Pepper MS. Role of matrix metalloproteinase and plasminogen activator –plasmin system in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1104-1117.

-Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Bell WC, Weiss H, Heimbürger DC et al. The expression of fatty acid synthase (FAS) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol* 2000; 31 (9): 1068-1073.

-Pizer ES, Chrest FJ, Diguseppe JA, Han WF. Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Res* 1998; 58: 4611-4615.

-Pizer ES, Jackisch C, Wood FD, Pasternack GR, Davidson NE, Kuhajda F. Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1996a; 56 (12): 2745-2747.

-Pizer ES, Thupari J, Han WF, Pinn ML, Chrest FJ, Frehywot GL et al. Malonyl-coenzyme A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Res* 2000; 60 (2): 213-218.

-Pizer ES, Wood FD, Heine HS, Romantsev FE, Pasternack GR, Kuhajda FP. Inhibition of fatty acid synthesis delays disease progression in a xenograft model of ovarian cancer. *Cancer Res* 1996b; 56 (6): 1189-1193.

-Puig T, Vázquez-Martín A, Relat J, Pétriz J, Menéndez JA, Porta R, Casals G, Marrero PF, Haro D, Brunet J, Colomer R. Fatty acid metabolism in breast cancer cells: differential inhibitory effects of epigallocatechin gallate (EGCG) and C75. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Jun;109(3):471-9. Epub 2007 Sep 28.

-Pollock, P.M. et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat. Genet.* 33, 19–20(2003).

-Quevedo WC Jr, Fleischmann RD. Developmental biology of mammalian melanocytes. *J Invest Dermatol* 1980; 75(1): 116-120.

-Qian F, Zhang ZC, Wu XF, Li YP, Xu Q. Interaction between integrin alpha (5) and fibronectin is required for metastasis of B16F10 melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 233 (4): 1269-75.

- Hangan VS, Joshi AK, Smith S. Mapping the functional topology of the animal fatty acid synthase by mutant complementation *in vitro*. *Biochemistry* 2001; 40 (36): 10792-10799.
- Raguse JD, Gath HJ, Bier J, Riess H, Oettle H. Cilengitide (EMD 121974) arrest the growth of a heavily pretreated highly vascularized head and neck tumor. *Oral Oncology* 2004; 40: 228-230.
- Ramos DM, Chen BL, Boylen K, Stern M, Kramer RH, Sheppard D, Nishimura SL et al. Stromal fibroblasts influence oral squamous-cell carcinoma cell interactions with tenascin-C. *Int J Cancer* 1997; 72: 369-376.
- Rigel DS, Friedman RJ, Kopf AW. The incidence of malignant melanoma in the United States: issues as we approach the 21st century. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34: 839.
- Rigel DS. Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer. *J Am Acad Dermatol* 2008. 58(5 suppl 2): S129-32.
- Rodolfo M, Daniotti M, Vallacchi V. Genetic progression of metastatic melanoma. *Cancer Letters* 2004; 214: 133-147.
- Rossi S, Ou W, Tang D, Bhattacharya N, Dei Tos AP, Fletcher JA, Loda M. Gastrointestinal stromal tumors overexpress fatty acid synthase. *J Pathol* 2006; 209: 369-375.
- Sabine JR, Abraham S, Chaikoff IL. Control of lipid metabolism in hepatomas: insensitivity of rate of fatty acid and cholesterol synthesis by mouse hepatoma BW7756 to fasting and to feedback control. *Cancer Res.* 1967 Apr;27(4):793-9.
- Seiki M. The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 624-632.
- Smith S, Witkowski A, Joshi AK. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Review Progress in lipid Research* 2003; 42: 289-317.
- Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, Coletta RD, Alves FA, Lopes MA et al. Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncology* 2004; 40: 688-696.

-Stoops JK, Wakil SJ. Animal fatty acid synthase. A novel arrangement of the β -ketoacyl synthetase sites comprising domains of the two subunits. *Journal of Biol Chem* 1981; 256 (10): 5128-5133.

-Sun B, Zhang S, Zhang D, Gu Y, Zhang W, Zhao X. The influence of different microenvironments on melanoma invasiveness and microcirculation patterns: an animal experiment study in the mouse model. *J Cancer Res Clin Oncology* 2007 *in press*.

-Swinnen JV, Heemers H, Doboel L, Fougelle F, Heyns W, Verhoeven G. Stimulation of tumor-associated fatty acid synthase expression by growth factor activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway. *Oncogene* 2000 (19) 5173-5181.

-Swinnen JV, Roskams T, Joniau S, Van Poppel H, Oyen R, Baert L et al. Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int J Cancer* 2002; 98 (1): 19-22.

-Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Timmermans L, De Schrijver E, Brusselmans K, Vanderhoydonc F et al. Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem Biophys Res* 2003; 302 (4): 898-903.

-Taniguchi S, Takeoka M, Ehara T, Hashimoto S, Shibuki H, Yoshimura N, Shigematsu H, Takahashi K, Katsuki M. Structural fragility of blood vessels and peritoneum in calponin h1-deficient mice, resulting in an increase in hematogenous metastasis and peritoneal dissemination of malignant tumor cells. *Cancer Res.* 2001 Oct 15;61(20):7627-34.

-Takahiro T, Shinichi K, Toshimitsu S. Expression of Fatty acid synthase as a prognostic indicator in soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res* 2003; 9 (6): 2204-2212.

-Tawil NJ, Gowri V, Djoneidi M, Nip J, Carbonetto S, Brodt P. Integrin α V β 3 can promote adhesion and spreading of metastatic breast carcinoma cells on the lymph node stroma. *Int. J. Cancer* 1996; 66: 703-710.

-Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005; 365: 687-701.

-Thupari JN, Pinn ML, Kuhajda FP. Fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells leads to malonyl-CoA-induced inhibition of fatty acid oxidation and cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285 (2): 217-223.

-Trika M, Zhou Z, Nemeth J, Chen Q, Sharp C, Emmell E, Giles-Komar J, Nakata M. CNTO 95, a fully human monoclonal antibody that inhibits αV integrins, has antitumor and antiangiogenic activity in vivo. *International Journal of Cancer* 2004; 100: 326-335.

-Tsukamoto Y, Wong H, Mattick JS, Wakil SJ. The architecture of the animal fatty acid synthetase complex. IV. Mapping of active centers and model for the mechanism of action. *J Biol Chem* 1983; 258 (24): 15312-15322.

-Tsopanoglou N, Papaconstantinou M, Flordellis C, Maragoudakis M. On the mode of action of thrombin-induced angiogenesis: Thrombin peptide, TP508, mediates effects in endothelial cells via $\alpha v \beta 3$ integrin. *Thrombosis and Haemostasis* 2004; 92: 846-857.

-Udart M, Utikal J, Krähn GM, Peter RU. Chromosome 7 aneusomy. A marker for metastatic melanoma? Expression of the epidermal growth factor receptor gene and chromosome 7 aneusomy in nevi, primary malignant melanomas and metastases. *Neoplasia*. 2001 May-Jun;3(3):245-54.

- Utikal J, Udart M, Leiter U, Peter RU, Krähn G. Additional Cyclin D(1) gene copies associated with chromosome 11 aberrations in cutaneous malignant melanoma. *Int J Oncol*. 2005 Mar;26(3):597-605.

-Vantyghem SA, Postenka CO, Chambers AF. Estrous cycle influences organ-specific metastasis of B16F10 melanoma cells. *Cancer Res*. 2003 Aug 15;63(16):4763-5.

-Väisänen A, Kallioinen M, Dickhoff KV, Lattikainen L, Hoyhtya M, Hujanen TT. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) immunoreactive protein – a new prognostic marker in uveal melanoma. *Journal of Pathology* 1999; 188: 56-62.

-Veiga SS. Detecção e caracterização bioquímica da GP 120/140 em melanoma murino. Homologias em melanoma humano [tese]. São Paulo: USP/Instituto de Química; 1994.

-Visca P, Alò PL, Del Nonno F, Botti C, Trombetta G, Marandino F et al. Immunohistochemical expression of fatty acid synthase, apoptotic-relating genes, proliferating factors, and ras protein product in colorectal adenomas, carcinomas and adjacent nonneoplastic mucosa. Clin Cancer Res 1999; 5 (12): 4111-4118.

-Vihinen P, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. International Journal Cancer 2002; 99: 157-166.

-Visca, P.; Sebastiani, V.; Pizer, E. S.; Botti, C.; De Carli, P.; Filippi, S.; Monaco, S.; Alo', P. L. Immunohistochemical expression and prognostic significance of FAS and GLUT1 in bladder carcinoma. Anticancer Res 2003; 23 (1A): 335-339.

-Vlad LD, Axiotis CA, Merino MJ. Fatty acid synthase is highly expressed in aggressive thyroid tumors. Mod Pathol 1999; 12: 70.

-Voura EB, Ramjeesingh RA, Montgomery AMP, Siu CH. Involvement of integrin $\alpha\text{V}\beta 3$ and cell adhesion molecule L1 in transendothelial migration of melanoma cells. Mol Biol Cell 2001; 12 : 2699-2710.

-Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, Lin AH, Markl ID. Virtually 100% of melanoma cell lines harbor alterations at the DNA level within CDKN2A, CDKN2B, or one of their downstream targets. Genes Chromosomes Cancer 1998; 22: 157-163.

-Wang X, Tian W. Green Tea Epigallocatechin Gallate: A natural inhibitor of fatty-acid synthase. Biochl Bioph Res Comm 2001b 288, 1200–1206

-Wang YY, Kuhajda FP, Li J, Finch TT, Cheng P, Koh C, Li T, Sokoll LJ, Chan DW. Fatty acid synthase as a tumor marker: its extracellular expression in human breast cancer. J Exp Ther Oncol. 2004 Jul;4(2):101-10

-Wang HQ, Altomare DA, Skele KL, Poulikakos PI, Kuhajda FP, Di Cristofano A, Testa JR. Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells. Wang HQ, Altomare DA, Skele KL, Poulikakos PI, Kuhajda FP, Di Cristofano A, Testa JR.

-Wakil S. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. Biochemistry 1989; 28: 4523-30.

-Westermarck J and Kahari V. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB* 1999; 13(5): 781-788.

-Weiss L, Hoffmann GE, Schreiber R, Andres H, Fuchs E, Korber E et al. Fatty-acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance. Purification, optimal assay conditions, and organ distribution of fatty-acid synthase. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1986; 367 (9): 905-912.

-Wollina U, Hipler UC, Knoll B, Graefe T, Kaatz M, Kirsh K. Serum matrix metalloproteinase-2 in patients with malignant melanoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2001; 127; 631-635.

-Xiong JP, Stehle T, Zhang R, Joachimiak A, Frech M *et al.* Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha V\beta 3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 2002; 5565(296): 151-155.

-Yorioka CW, Coletta RD, Alves F, Nishimoto IN, Kowalski LP, Graner E. Matrix metalloproteinase-2 and -9 activities correlate with the disease-free survival of oral squamous cell carcinoma patients. *Int J Oncol* 2002; 20 (1); 189-194.

-Zhang Y, Wang C, Mizukami H, Itoh H, Kusama M, Ozawa K, Jinbu Y. Increased expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in O-1N: hamster oral squamous cell carcinoma with high potential lymph node metastasis. *Journal Experimental Clinical Cancer Research* 2006; 25 (3): 417-423.

-Zhou W, Simpson PJ, McFadden JM, Townsend CA, Medghalchi SM, Vadlamudi A, Pinn ML, Ronnett GV, Kuhajda FP. Fatty acid synthase inhibition triggers apoptosis during S phase in human cancer cells. *Cancer Res.* 2003 Nov 1;63(21):7330-7.



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

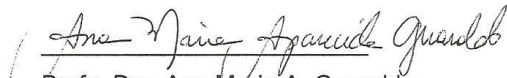
CERTIFICADO

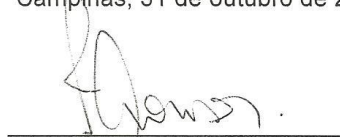
Certificamos que o Protocolo nº 1365-1, sobre "Estudo das consequências do bloqueio da produção endógena de ácidos graxos sobre a expressão das integrinas e MMPs em modelo murino de melanoma", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Edgard Graner / Marco Antonio Carvalho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 31 de outubro de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1365-1, entitled "The effect of endogenous fatty acid synthesis inhibition on the expression of integrins and MMPs in a murine model of melanoma", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on October 31, 2007.

Campinas, 31 de outubro de 2007.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>